

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Vermehrung des
aviären Adeno-assoziierten Virus
(AAAV)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susann Hauschild
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1984
Journal Nr. 1207

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Untersuchungen zur Vermehrung des
aviären Adeno-assoziierten Virus
(AAAV)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susann Hauschild
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1984
Journal Nr. 1207

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:	Prof. Dr. F. Hörchner
Referent:	Prof. Dr. G. Monreal
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. G. Pauli

Tag der Promotion: 2. November 1984

ABKÜRZUNGEN

AAAV	Aviäres Adeno-assoziiertes Virus
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
CELO-Virus	Chicken-Embryo-Lethal-Orphan-Virus (FAV 1)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAV	Fowl Adenovirus
FFE	Fluoreszierende-Fokus-bildende Einheiten
F.I.T.C.	Fluoresceinisoithiocyanat
h.p.i.	Hours post infectionem
IF-Test	Indirekter Immunofluoreszenztest
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität)
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
PBE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
p.i.	Post infectionem
RNS	Ribonukleinsäure
SPF	Spezifiziert pathogen-frei
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
UPM	Umdrehungen pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS	<u>Seite</u>
1. Einleitung	7
2. Literaturübersicht	8
2.1. Adeno-assoziierte Viren (AAV)	8
2.2. Adenoviren	16
3. Material und Methoden	19
3.1. Virusstämme und Virusvermehrung	19
3.1.1. Aviäres Adeno-assoziiertes Virus (AAAV)	19
3.1.2. Aviäre Adenoviren	19
3.2. Reinigung des aviären Adeno-assoziierten Virus	20
3.2.1. Uvasol-Reinigung	20
3.2.2. CsCl-Stufengradient	21
3.2.3. CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten	22
3.2.4. Neutraler Sucrose-Gradient	22
3.2.5. Immunopräzipitation	23
3.3. Kükennierenzellkulturen	24
3.4. Bestimmung der Zellzahl	25
3.5. Vermehrungsuntersuchungen	25
3.6. Titrationsmethoden	26
3.6.1. Indirekter Immunofluoreszenztest (IF-Test)	26
3.6.2. Plaquetest	26
3.7. Herstellung von Antiseren im Kaninchen	28
4. Versuchsergebnisse	29
4.1. Reindarstellung des aviären Adeno-assoziierten Virus	29
4.2. Bestimmung der Infektiosität des AAAV mit Hilfe der Immunofluoreszenz	33

	<u>Seite</u>
4.3. Vermehrungszyklen des AAV und seiner Helferviren	34
4.3.1. Vermehrungszyklen von AAV und Helferviren nach Beimpfung mit einer gleichen Multiplizität von 10	35
4.3.2. Vermehrung des AAV nach Infektion mit niedriger Multiplizität	38
4.3.3. Vermehrungsuntersuchungen nach Infektion mit höherer Multiplizität des AAV und einer geringen Multiplizität der Helferviren	40
4.3.4. Einfluß des AAV auf die Vermehrung der Helferviren	42
4.3.5. Vermehrung des AAV nach Infektion mit der schweren AAV-Fraktion	45
5. Diskussion der Ergebnisse	50
6. Zusammenfassung	58
Summary	60
7. Literaturverzeichnis	61

1. EINLEITUNG

Die aviären Adeno-assoziierten Viren sind defekte Parvoviren (Dependoviren). Ihre Vermehrung ist, ebenso wie die der Adeno-assoziierten Viren, welche bei anderen Tierarten und vor allem beim Menschen nachgewiesen wurden, von einem Helfervirus abhängig. Als Helfer wurden zunächst die Adenoviren identifiziert, woraus sich der Name Adeno-assoziiertes Virus ableitet.

Inwieweit den aviären Adeno-assoziierten Viren eine ätiologische Bedeutung bei Geflügelkrankheiten zukommt, ist bisher noch unklar. Ein erkennbarer Effekt ist lediglich in der Beeinflussung ihrer Helferviren nachgewiesen (69).

Während über die humanen Adeno-assoziierten Viren schon vieles bekannt ist, sind die aviären Adeno-assoziierten Viren noch nicht so eingehend erforscht. Aufgrund der erforderlichen anderen Zellsysteme ist es teilweise auch schwierig, die Erkenntnisse aus der Forschung über die humanen Adeno-assoziierten Viren auf die aviären Adeno-assoziierten Viren zu übertragen.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Vermehrung der aviären Adeno-assoziierten Viren zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist hierbei der Einfluß verschiedener aviärer Adenoviren als Helferviren. Dabei soll gleichzeitig geprüft werden, inwieweit eine wechselseitige Beeinflussung der aviären Adeno-assoziierten Viren und der Adenoviren als Helfer auftritt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Anfang der sechziger Jahre wurden verschiedene Gruppen von Wissenschaftlern erstmalig auf die defekten Parvoviren aufmerksam. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von menschlichen und tierischen Adenoviruspräparationen wurden kleine, die Adenoviren kontaminierende Partikel entdeckt. Die von den Adenoviren der Maus isolierten 20 nm großen Partikel wurden schnell als nicht von Helferviren abhängige Parvoviren erkannt und als Minute Virus of Mice (MVM) bezeichnet (23, 35), während die morphologisch ähnlichen Partikel aus Adenoviruspräparationen von Menschen und Affen zunächst als Untereinheiten oder Bruchstücke der 70 bis 90 nm großen Adenoviren angesehen wurden (54, 61). Weitere Untersuchungen ergaben aber, daß es sich um defekte Parvoviren handelt, deren Vermehrung abhängig ist von der Gegenwart und Hilfe der Adenoviren (1, 3, 36, 41, 55, 67).

MAYOR et al. (56), PARKS et al. (67) und ITO et al. (41) bezeichneten diese defekten Viren als Adeno-Satelliten-Viren und zogen damit Vergleiche zum ebenfalls defekten Satelliten-virus des Tabaknekrosevirus (43), während ATCHISON et al. (3) den heute gültigen Namen Adeno-assoziiertes Virus prägten. Innerhalb der Klassifikation und Nomenklatur der Viren (53) werden die Adeno-assoziierten Viren auch als Dependoviren bezeichnet.

DUTTA und POMERY (29) berichteten 1965 erstmalig über das Vorkommen kleiner Partikel in Präparationen des Olsonstammes

des Wachtelbronchitisvirus, eines aviären Adenovirus, das serologisch mit dem CELO-Phelps Stamm identisch ist. Später wurde deutlich, daß es sich bei diesen kleinen Partikeln um ein aviäres Adeno-assoziiertes Virus handelt.

Von den Adeno-assoziierten Viren, die zur Familie der Parvoviridae gehören, sind inzwischen beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten folgende Arten bekannt (5, 6, 53).

AAV Typ 1	(Mensch)
AAV Typ 2	(Mensch)
AAV Typ 3	(Mensch)
AAV Typ 4	(Mensch, Affe)
Aviäres AAV	(Geflügel)
Bovines AAV	(Rind)
Canines AAV	(Hund)

Vermutlich existieren auch noch

Equines AAV	(Pferd)
Ovines AAV	(Schaf)

Das unbehüllte AAV-Virion hat einen Durchmesser von 20 nm. Es zeigt ikosaedrale Symmetrie. Das Viruskapsid enthält 3 Polypeptide (2 Minor-Polypeptide und 1 Mayor-Polypeptid), die vermutlich 32 Kapsomeren bilden (42, 75). Das AAV-Genom besteht aus linearer plus oder minus Einzelstrang-DNS, die komplementär ist und sich in vitro zu einer Doppelstrang-DNS formieren kann (8, 9, 57, 73). Nur 70 bis 80 % des DNS-minus-Stranges wird in virale RNS transkribiert, während am DNS-plus-Strang keine Transkription stattfindet (16, 17).



Die Adeno-assoziierten Viren sind äther- und chloroform-resistent sowie hitze- und pH-stabil (56°C , 60 Min.; pH 3 - 9) (5).

Alle Adeno-assoziierten Viren der Menschen und der Säuger besitzen ein gemeinsames Antigen, welches durch fluoreszierende Antikörper nachgewiesen werden kann (6, 53). Mit ihren Helfer-viren sind die Adeno-assoziierten Viren jedoch nicht anti-genetisch verwandt (72).

Bei der Vermehrung der Adeno-assoziierten Viren entstehen, wie auch von anderen nicht defekten Parvoviren bekannt (22, 71, 77), Viruspartikel unterschiedlicher Dichte (49). Diese Viruspartikel bilden im isopyknischen Gleichgewichtsgradienten Banden unterschiedlicher Dichtebereiche, über die folgende Angaben gemacht werden:

Virusart	Dichtebereiche in g/cm^3			Literatur
	nicht-infektiöses AAV	leichtes AAV	schweres AAV	
AAV Typ 1	1,30 und 1,33 - 1,36	1,39-1,44	über 1,45	(86)
AAV Typ 2	1,32 und 1,35	1,41	1,45	(46)
	1,32 und 1,35	1,40-1,42	1,45-1,47	(60)
AAV Typ 3	1,33 - 1,36	1,388 - 1,445	über 1,45	(42)
aviäres AAV -		1,38	1,42	(69)
	1,34	1,39	1,42	(81)

Die Dichtebereiche um $1,41\text{ g/cm}^3$ und $1,45\text{ g/cm}^3$ beziehungsweise $1,39\text{ g/cm}^3$ und $1,42\text{ g/cm}^3$ für das aviäre AAV enthalten infektiöses leichtes ($1,41\text{ g/cm}^3$) und schweres ($1,45\text{ g/cm}^3$)

Adeno-assoziiertes Virus. Die AAV-Partikel der Dichtebereiche $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,35 \text{ g/cm}^3$ sind nicht infektiös. Sie enthalten zumeist keine DNS sondern bestehen hauptsächlich nur aus leeren AAV-Kapsiden. Einige dieser nicht infektiösen AAV-Partikel besitzen jedoch eine beschädigte DNS und können so mit der Vermehrung der infektiösen Partikel interferieren. Sie werden als DI (defective interfering)-Partikel bezeichnet (46, 59). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HOGGAN (38) ergaben, daß die schweren AAV-Partikel um 10 bis 20 % kleiner sind als die leichten AAV-Partikel. PRONOVOST et al. (70) untersuchten das aviäre AAV und stellten einen Größenunterschied von 12 bis 20 % fest. Untersuchungen von DE LA MAZA und CARTER (60) zufolge werden zu Beginn einer AAV-Infektion die schweren und leichten AAV-Partikel im gleichen Maße gebildet. Mit fortschreitender Infektionsdauer überwiegt dann die Bildung der leichten Partikel. PRONOVOST et al. (70) führen dies auf eine im Laufe der Infektion auftretende Dichterverschiebung (Density shift) von schweren zu leichten AAV-Partikeln zurück.

YATES et al. (81) haben erstmalig 1973 das vom Wachtelbronchitisvirus isolierte aviäre AAV untersucht und es als Äquivalent zu den Adeno-assoziierten Viren, die von anderen Tierarten und vom Menschen isoliert wurden, bezeichnet. Untersuchungen von MISHAD et al. (62) ergaben, daß über 50 % der aviären Adenoviren mit aviärem AAV kontaminiert sind. Alle diese aviären AAV-Isolate sind antigenetisch mit dem vom Wachtelbronchitisvirus isolierten aviären AAV verwandt.

Es ist noch nicht geklärt, ob das aviäre AAV beim Geflügel Krankheiten auslöst (84). YATES et al. (83) konnten nachweisen, daß sich von gesund erscheinenden Hühnern neben Adenoviren auch aviäre Adeno-assoziierte Viren isolieren lassen. DAWSON et al. (25, 27) beobachteten, daß das aviäre AAV ebenso wie die zu seiner Vermehrung erforderlichen

Adenoviren während einer Infektion der Hennen auf das Ei übertragen werden. Die Viren konnten während der ersten 7 Tage der Infektion aus den Eiern isoliert werden, bis 15 - 17 Tage nach der Infektion präzipitierende Antikörper gegen das aviäre AAV und die Adenoviren im Albumin der Hühnereier auftraten (26). YATES et al. (82) zeigten in ihren Untersuchungen, daß die präzipitierenden aviären AAV-Antikörper im Serum von infizierten Hühnern als ein früher Indikator für eine Adenovirus-Infektion genutzt werden könnten, da sich die aviären AAV-Antikörper im Serum mit Hilfe des Immunodiffusionstestes zwei oder mehr Wochen vor den Adenovirus-Antikörpern nachweisen lassen. Als geeignete Nachweisteste für die aviären AAV-Antikörper erwiesen sich neben dem nicht so sensitiven Immunodiffusionstest besonders der ELISA und der Virusneutralisationstest (24). Das aviäre AAV läßt sich gut in embryonierten Hühnereiern, Hühnerembryonieren- und Kükenieren-Zellkulturen vermehren, wenn diese gleichzeitig mit Adenoviren infiziert werden (81).

Die Adeno-assoziierten Viren bedürfen eines Helfervirus für ihre Vermehrung. Adenoviren unterstützen als komplette Helfer die AAV-Replikation, in ihrer Gegenwart werden infektiöse AAV-Partikel gebildet (3). Nach Untersuchungen von ATCHISON (2), BLACKLOW et al. (12), BOUCHER et al. (14) und SALO et al. (76) üben auch Herpesviren eine Helferfunktion aus. In ihrer Gegenwart entstehen zwar AAV-DNS, AAV-mRNS, AAV-Antigene und AAV-Strukturproteine, es konnte aber zunächst kein infektiöses Virus nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen von BULLER et al. (15) konnten jedoch zeigen, daß Herpes simplex Virus 1 und Herpes simplex Virus 2 als komplette Helfer die AAV-Replikation unterstützen können.

Das Adeno-assoziierte Virus weist in seiner Replikation vermutlich zwei defekte Stellen auf (47). Der eine Defekt liegt in der Nukleinsäuresynthese, der zweite in der Maturation der

Viruspartikel (86). Mit Hilfe der Adenoviren können beide Defekte im AAV-Replikationszyklus behoben werden, während in Anwesenheit von Herpesviren eine Maturation der AAV-Partikel anscheinend nicht immer stattfindet (76, 86).

Das Adeno-assoziierte Virus kann auch latent in den Wirtszellen existieren. HOGGAN et al. (40) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß in Abwesenheit eines Helfervirus das AAV-Genom in das Wirtszellgenom integriert wird. Eine später folgende Adenovirus-Infektion der Zellen induziert dann die Bildung von infektiösem AAV. ROSE und KOCZOT (74) zeigten durch Versuche mit radioaktiver AAV-DNS, daß Adsorption, Penetration und Migration der AAV-Nukleinsäure in den Zellkern helferunabhängig ablaufen. HANDA et al. (34) fanden in der Zell-DNS von latent mit AAV Typ 1 infizierten Zellen Kopien von AAV Typ 1-spezifischen Nukleinsäuresequenzen. CHEUNG et al. (21) halten es aufgrund ihrer Untersuchungen von latent infizierten humanen Detroit 6 Zellen für möglich, daß ein Teil der AAV-DNS auch als Plasmid in den Wirtszellen existiert.

Latente AAV-Infektionen sind weit verbreitet. Nach Angaben von HOGGAN et al. (40) sind 2 % der primären menschlichen Embryonierzellen und 20 % der African Green Monkey-Nierenzellen latent mit Adeno-assoziierten Viren infiziert. Das AAV-Genom kann über viele Zellgenerationen hinweg im Wirtsgenom persistieren (10, 86). CHEUNG et al. (21) berichteten, daß latent infizierte Detroit 6 Zellen noch nach über 100 Zellpassagen infektiöses AAV produzierten, wenn sie mit Adenoviren infiziert wurden.

Inwieweit eine latente AAV-Infektion für den Wirt Konsequenzen hat, ist noch nicht geklärt (21). Eine latente AAV-Infektion könnte sogar einen Schutz vor Adenovirus- und Herpesvirus-Erkrankungen bieten, da es den Adeno-assoziierten Viren möglich ist, die Onkogenität und Replikation von Adenoviren

(18, 20, 44, 58), sowie die Onkogenität von Herpes simplex Viren (13) zu hemmen.

Studien von DAWSON et al. (28) haben ergeben, daß auch das aviäre Adeno-assozierte Virus latent in Kükennierenzellen existiert. MISHAD et al. (62) halten es für möglich, daß die Kontamination der aviären Adenoviren mit dem aviären AAV von latent mit aviären AAV infizierten Kükennierenzellen herrührt, die als Wirtszellen für die Adenoviren benutzt wurden.

Die Adeno-assozierten Viren können die als Helfervirus eingesetzten Adenoviren beeinflussen. HOGGAN et al. (39) und SMITH und THIEL (79) berichteten darüber, daß Adenovirusstämme durch die Anwesenheit von AAV in ihrer Vermehrung gehemmt werden. Nach Untersuchungen von PARKS et al. (67) reduziert das AAV Typ 4 die Adenovirusausbeute um 90 % bei simultaner oder einer um 12 Stunden vor den Adenoviren liegenden Beimpfung der Zellen. Die Multiplizität des AAV muß dabei über 10 betragen. Wird das AAV erst 12 Stunden nach den Adenoviren auf die Zellen verimpft, verringert dies die Adenovirus-Produktion noch um 23 %.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (ATCHISON et al., 4) von AAV-infizierten Zellkulturen zeigten, daß die Adeno-assozierten Viren im Kern von doppelt (AAV und Adenoviren) infizierten Zellen vermehrt werden. Dabei konnte auch beobachtet werden, daß die Zellkerne, die viel AAV freigeben, nur eine geringe Anzahl von Adenoviren enthalten. Es scheint demnach, daß das AAV die Fähigkeit von doppelt infizierten Zellen, Adenoviren zu produzieren, herabsetzt.

CASTO et al. (19) konnten in ihren Untersuchungen über das AAV Typ 1 und einige Adenoviren feststellen, daß die Hemmung der Adenoviren direkt von der eingesetzten Menge des AAV abhängig ist. Je höher die Multiplizität des AAV ist, desto

stärker werden die Adenoviren in ihrer Vermehrung gehemmt. Andererseits sind die Adenoviren in der Lage, die hemmende Wirkung des AAV zu überwinden, wenn sie selbst mit einer hohen Multiplizität verimpft werden.

PRONOVOST et al. (69) untersuchten den Einfluß des aviären Adeno-assoziierten Virus auf die Plaque-Produktion aviärer Adenoviren. Sie beobachteten, daß das leichte und das schwere aviäre AAV die Adenoviren unterschiedlich beeinflussen. Während das leichte aviäre AAV mit ansteigender Multiplizität die Plaque-Produktion immer stärker hemmt, fördert das schwere aviäre AAV bei einer Multiplizität von 0,1 bis 10 die Plaque-Produktion der Adenoviren. Erst bei einer Multiplizität über 40 zeigt auch das schwere aviäre AAV einen hemmenden Einfluß auf die Adenoviren.

PRONOVOST et al. (68) konnten nachweisen, daß das aviäre AAV auch die Pathogenität einer aviären Adenovirus-Infektion herabsetzen kann. Diese Wirkung verstärkt sich ebenfalls mit steigender Menge des eingesetzten aviären AAV. YATES et al. (85) stellten fest, daß eine zusätzliche aviäre AAV-Infektion bei mit Adenoviren (CELO-Virus) infizierten Hühnern eine Verminderung der präzipitierenden CELO-Virus-Antikörper bewirkt.

Bestimmte Adenovirusstämme unterscheiden sich in ihrer Helferfunktion. Untersuchungen von SMITH et al. (78) und SMITH und THIEL (79) haben ergeben, daß sich langsam vermehrende und nur einen geringen zytopathischen Effekt verursachende humane Adenovirusstämme (Stamm 12 und 18) gegenüber sich schneller vermehrenden humanen Adenovirusstämmen (Stamm 1, 2, 4 und 6) die Vermehrung der Adeno-assoziierten Viren deutlich besser unterstützen.

BLACKLOW et al. (11) untersuchten unter Anwendung eines

indirekten Immunofluoreszenztestes den humanen Adenovirusstamm 7 und das humane AAV Typ 1. Sie stellten dabei fest, daß bei gleichzeitiger Beimpfung der Zellen sowohl das Adenovirus-Antigen als auch das AAV-Antigen nach einer Latenzzeit von 14 bis 15 Stunden erscheinen und nach 24 bis 48 Stunden ein Plateau erreichen. Die Latenzzeit des AAV läßt sich jedoch durch eine um mindestens 10 Stunden vor dem AAV erfolgende Beimpfung der Zellen mit den Adenoviren auf eine minimale Zeit von 5 bis 6 Stunden verkürzen. Wird jedoch das AAV 15 Stunden vor den Adenoviren auf die Zellen verimpft, so verlängert sich seine Latenzzeit auf 29 Stunden. BLACKLOW et al. (11) schließen aus diesen Ergebnissen, daß eine mit Adenoviren infizierte Zelle nach 10 Stunden die für die AAV-Vermehrung nötigen Faktoren produziert und daß dies zeitlich mit der DNS-Replikation der Adenoviren zusammenfällt (33).

2.2. Adenoviren

Im Zusammenhang mit den experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden aviäre Adenoviren verschiedener Serotypen eingesetzt.

Die Adenoviren sind unbehüllte, 70 bis 90 nm große Viren, die eine lineare doppelsträngige DNS enthalten. Ihre Form ist ikosaedrisch. Die Nukleokapside tragen 252 Kapsomeren (240 Hexone und 12 Pentone, die mit Fibern ausgestattet sind). Die Gruppe der Adenoviren wurde 1975 aufgrund verschiedener gruppenspezifischer Antigene, die keine immunologischen Kreuzreaktionen zeigen, in zwei Genera unterteilt. Das Genus Mastadenoviridae umfaßt dabei die Adenoviren der Mammalier, während das Genus Aviadenoviridae die Adenoviren der Vögel bezeichnet (66, 80).

Die Adenoviren der Hühner (Fowl Adenoviruses - FAV) stellen

mit 12 Serotypen die größte Gruppe innerhalb der aviären Adenoviren dar, die nach der Einteilung von McFERRAN et al. (52) als FAV 1 bis FAV 11, später bis FAV 12 (50) bezeichnet werden. GELDERBLOM und MAICHLE-LAUPPE (32) konnten nachweisen, daß die Pentone der aviären Adenoviren FAV 1 bis FAV 11 jeweils 2 Fibern unterschiedlicher Länge besitzen. Die Adenoviren der Hühner, mit Ausnahme des FAV 1, hämagglutinieren nicht (50).

Die aviären Adenoviren sind weit verbreitet und führen meist zu inapparenten Infektionen (64). Sie können jedoch auch definierte Krankheitssyndrome auslösen, wie die Einschlußkörperchen-Hepatitis der Hühner (37) und eine aplastische Anaemie der Hühner (30). Der Stamm FAV 1, identisch mit dem CELO-Virus kann respiratorische Erkrankungen hervorrufen (51). Eine zusammenfassende Darstellung der aviären Adenoviren findet sich bei McFERRAN und ADAIR (51).

Das Egg-Drop-Syndrom 76 Virus (EDS 76 Virus), ebenfalls ein aviäres Adenovirus, jedoch nicht antigenetisch mit den Stämmen FAV 1 bis FAV 12 verwandt, verursacht beim Huhn das Egg-Drop-Syndrom (65). Dieses aviäre Adenovirus besitzt im Unterschied zu den FAV-Stämmen nur eine Fiber auf den Pentonen und zeigt starke hämagglutinierende Eigenschaften (32, 45).

Neben den Adenoviren der Hühner sind auch bei Puten, Gänsen, Fasanen und Enten spezifische aviäre Adenoviren bekannt, die zum Teil zu bestimmten Krankheiterscheinungen führen (51, 80), darunter vor allem die hämorrhagische Enteritis der Puten (31).

Die aviären Adenoviren lassen sich in Zellkulturen, besonders in Nieren- und Leberzellkulturen von Küken wie auch in Hühnerembryonen vermehren. Die Virusvermehrung läuft im Zellkern mit einem zytopathischen Effekt ab (51).

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde FAV 1 als der am häufigsten im Zusammenhang mit aviärem Adeno-assoziiertem Virus beschriebene Stamm verwendet (81). Im Vergleich hierzu war es von Interesse, die Wechselbeziehungen zwischen aviärem AAV und den Serotypen FAV 5 und FAV 8 zu untersuchen, da diese beiden Serotypen häufig mit Krankheitserscheinungen wie Einschlußkörperchen-Hepatitis (37) und der aplastischen Anämie (30) ätiologisch in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem zeichnet sich FAV 5 (Stamm 340) durch eine relativ langsame Vermehrung aus (Monreal, G., mündliche Mitteilung), sodaß die Interaktionen mit dem aviären AAV bei diesem Stamm deutlich in Erscheinung treten könnten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Virusstämme und Virusvermehrung

3.1.1. Aviäres Adeno-assoziiertes Virus (AAAV)

Als Ausgangsmaterial für die Vermehrung der Adeno-assoziierten Viren diente der Stamm ATCC VR-865, den wir von der American Type Culture Collection erhielten. Es handelt sich hierbei um das von YATES et al. 1973 (81) beschriebene Virus aus dem Wachtelbronchitisvirus-Stamm.

Die Virusvermehrung erfolgte in embryonierten Eiern von SPF-Hühnern (Valo, Lohmann Tierzucht Cuxhaven). Embryonen wurde am 11. Bebrütungstag 0,2 ml Virusmaterial (1:5 in PBS verdünnt), bestehend aus AAAV, mit einem Titer von ca. 2×10^8 FFE/ml und dem aviären Adenovirus CELO-Phelps, mit einem Titer von $1,2 \times 10^8$ PFU/ml, in die Allantoishöhle verimpft.

Embryonen, die innerhalb von 48 Stunden abstarben, wurden verworfen. Am 4. Tag nach der Infektion wurde die Allantoisflüssigkeit der lebenden und abgestorbenen Embryonen geerntet, gepoolt und bei 5000 UPM (Christ, Minifuge) 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C tiefgefroren.

3.1.2. Aviäre Adenoviren

Als aviäres Adenovirus des Serotyps FAV 1 wurde der Stamm CELO-Phelps (63) verwandt. Die aviären Adenovirusstämme der Serotypen FAV 5 und FAV 8 wurden dem Institut für Geflügel-

krankheiten der FU Berlin ursprünglich von Dr. McFerran, Stormont, Belfast überlassen. Alle Stämme wurden in unserem Laboratorium dreimal über Plaquepassagen geklont und weiter passagiert.

Als Ausgangsmaterial für die Virusvermehrung dienten für FAV 1 (Stamm CELO-Phelps) die 10., für FAV 5 (Stamm 340) die 11. und für FAV 8 (Stamm Hungaria VI) die 12. Küken-nierenzellkulturpassage nach der Klonierung.

Die Vermehrung der aviären Adenoviren erfolgte auf Küken-nierenzellkulturen. Das geerntete Virusmaterial wurde nach Einfrieren und Auftauen kurz (10 sec.) beschallt (Sonifier, Branson). Der Titer wurde im Plaquetest bestimmt und das virushaltige Zellkulturmaterial bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

3.2. Reinigung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV)

Die AAAV- und Helfervirus-haltige Allantoisflüssigkeit unterlag nach dem Auftauen folgenden Reinigungsschritten:

3.2.1. Uvasol-Reinigung

350 ml Allantoisflüssigkeit wurden mit der halben Menge (175 ml) 1,1,2 Trichlortrifluorethan (Uvasol, Merck) versetzt, dreimal 1 Minute homogenisiert (Ultraturax, Stufe 8 - 9) und bei 2200 g 15 Minuten in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde noch einmal der gleichen Prozedur unterworfen. Die Sedimente der 1. und 2. Zentrifugation wurden sodann mit 250 - 300 ml TE-Puffer (50 mMol Tris-Puffer, 5 mMol EDTA, pH 7,8) versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Dieser Überstand, zusammen mit dem Überstand der vorherge-

gangenen Zentrifugation, ergaben ca. 600 ml. Diese wurden erneut mit 150 ml (1/4 der Überstandsmenge) Uvasol versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Der nunmehr gewonnene Überstand (ca. 600 ml) wurde noch einmal mit 150 ml Uvasol versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Nach dieser letzten Zentrifugation wurde die auf diese Weise gereinigte Allantoisflüssigkeit bis zu weiteren Reinigungsschritten bei -70°C tiefgefroren.

3.2.2. CsCl-Stufengradient

Die mit Uvasol vorgereinigte Allantoisflüssigkeit wurde über CsCl-Stufengradienten konzentriert.

Für den Stufengradienten wurden in Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen (25mm x 89 mm, Beckmann) 6 ml CsCl-Lösung (CsCl für die Dichtegradientenzentrifugation, Roth, Karlsruhe) der Dichte $1,70\text{ g/cm}^3$ mit 6 ml CsCl-Lösung der Dichte $1,30\text{ g/cm}^3$ überschichtet. Nach Überschichtung der CsCl-Lösung mit der vorgereinigten Allantoisflüssigkeit wurde in einem SW 27-Rotor bei 27.000 UPM, 4°C (Beckmann Ultrazentrifuge L 5 - 65 B) für eine Dauer von 2,5 Stunden zentrifugiert. Der Überstand, etwa 27 ml, wurde abgehoben, erneut vorgereinigte Allantoisflüssigkeit aufgegeben und wie oben zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, so daß das Virus aus 5 Läufen in die CsCl-Lösung konzentriert wurde.

Nach Abschluß der letzten Zentrifugation zeigte sich folgendes Bild:

Unter einer diffusen Proteinschicht (zelluläre Suborganellen und Bruchstücke) erschien eine schmale und deutlich begrenzte Bande bei einer Dichte von $1,35\text{ g/cm}^3$, die den Adenoviren entspricht. Darunter befand sich eine nur schwach sichtbare

Bande bei einer Dichte von etwa $1,40 \text{ g/cm}^3$ in der sich das AAVV fand. Durch seitliche Punktion der Röhrchen wurde das Virusmaterial im Dichtebereich von $1,38 \text{ g/cm}^3$ bis $1,48 \text{ g/cm}^3$ entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4° C gekühlt.

3.2.3. CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten

Das Virusmaterial aus dem CsCl-Stufengradienten wurde im 60 Ti-Rotor bei 40.000 UPM, 4° C über 36 bis 40 Stunden zentrifugiert. Nach dem Lauf zeigten sich deutlich 4 Virusbanden unterschiedlicher Dichtebereiche. Das infektiöse AAVV befand sich in den Virusbanden der Dichte $1,39 - 1,40 \text{ g/cm}^3$ (leichtes AAVV) und $1,44 - 1,45 \text{ g/cm}^3$ (schweres AAVV), die durch seitliches Anstechen der Röhrchen gewonnen wurden. Die Banden der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,35 \text{ g/cm}^3$ enthielten nicht-infektiöses AAVV. Die Bande der Dichte $1,35 \text{ g/cm}^3$ enthielt zusätzlich Adenoviren.

Es folgte, für leichtes und schweres AAVV getrennt, ein zweiter CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradient unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen mit einer CsCl-Lösung der Dichte $1,39 - 1,40 \text{ g/cm}^3$ für leichtes und einer CsCl-Lösung der Dichte $1,44 - 1,45 \text{ g/cm}^3$ für schweres AAVV. Nach diesem Lauf waren nur die Banden mit der jeweiligen Dichte der AAVV-Spezies deutlich erkennbar. Durch seitliche Punktion wurde das Virusmaterial entnommen, für 24 Stunden gegen TE-Puffer dialysiert und danach bei 4° C aufbewahrt bis weitere Reinigungsschritte folgten.

3.2.4. Neutraler Sucrose-Gradient

Für eine weitere Reinigung der leichten AAVV-Fraktion wurde zunächst, anschließend an den zweiten Gleichgewichts-Dichte-

gradienten, eine Zentrifugation im neutralen Sucrose-Gradienten durchgeführt. Dieser Reinigungsschritt konnte entfallen, als sich herausgestellt hatte, daß die übrigen Reinigungsschritte genüigten, um ein ausreichend gereinigtes AAAV zu gewinnen (siehe Ergebnisteil).

Die Zentrifugation im Sucrose-Gradienten wurde wie folgt durchgeführt: Das AAAV-Material (etwa 1 ml) wurde auf einen linearen Sucrose-Gradienten (5 - 20 % Sucrose, Sigma, München, gelöst in TE-Puffer, pH 7,8, 1 M NaCl; Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen 15 mm x 95 mm) gegeben und im SW 40-Rotor bei 37.000 UPM, 4° C für 2 Stunden zentrifugiert. Aufgrund des etwa 4-fach höheren S-Wertes (Svedberg-Konstante) sedimentierten die noch vorhandenen Adenoviren in diesem Zeitraum auf den Boden der Zentrifugenröhrchen, während die AAAV-Partikel im unteren Drittel des Sucrose-Gradienten eine gut sichtbare Bande bildeten, die durch seitliches Anstechen der Röhrchen gewonnen werden konnte. Es folgte eine 24-stündige Dialyse gegen isotonischen Tris-Puffer (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,2). Das Virusmaterial wurde bis zur Durchführung weiterer Reinigungsschritte bei 4° C gekühlt.

3.2.5. Immunopräzipitation

Das im neutralen Sucrose-Gradienten oder im CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten konzentrierte AAAV wurde zur Bindung noch vorhandener Adenoviren mit einem spezifischen FAV 1-Antiserum behandelt (7). Dazu wurden etwa 1 bis 2 ml der AAAV-Suspension mit 0,01 bis 0,02 ml (1/100 des Volumens der AAAV-Suspension) FAV 1-Antiserum von Kaninchen versetzt und für 6 Stunden bei 4° C leicht geschüttelt. Darauf wurde in isotonischem Tris-Puffer vorgequollene Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Schweden) (1 ml gequollenes

Sepharose-Gel enthält 2 mg Protein A) hinzugefügt. Diese Mischung wurde 2 Stunden bei 4° C langsam geschüttelt. Durch eine anschließende Zentrifugation (3000 g, 10 Min.) wurde das Sepharose-Gel mit dem gebundenen Immunkomplex sedimentiert. Das im Überstand befindliche AAAV wurde in einem dritten CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten, der unter den gleichen Bedingungen wie der zweite CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradient erfolgte (siehe 3.2.3.), konzentriert. Durch seitliche Punktion wurde das gereinigte leichte bzw. schwere AAAV gewonnen und abschließend 24 Stunden gegen isotonischen Tris-Puffer dialysiert. Bis zum Gebrauch wurde das gereinigte AAAV-Material bei - 20° C eingefroren.

3.3. Kükennierenzellkulturen

Für die Adenovirusvermehrung, den Plaquetest, den Immunofluoreszenztest und die Vermehrungsversuche wurden Kükennierenzellkulturen verwandt, die nach der üblichen Methode präpariert wurden.

Die Nieren 21 Tage alter SPF-Küken wurden nach Zerkleinerung 6- bis 7-mal für eine Dauer von 10 Minuten bei Zimmertemperatur trypsiniert (0,05 % Trypsinlösung) und anschließend 3-mal in Anzuchtmedium (Earle-Medium, 10 % foetales Kälberserum, 10 % Tryptosephosphatbouillon, Antibiotikazusatz) gewaschen. Die Zellzahl wurde auf 6×10^5 Zellen/ml Anzuchtmedium eingestellt. Nach Bebrütung über etwa 72 Stunden bei 38,5° C in einer 7 %igen CO₂-Atmosphäre wurden die dichten Zellrasen nach Absaugen des Anzuchtmediums mit den jeweiligen Virussuspensionen beimpft.

Für die Adenovirusvermehrung wurden Zellkulturschalen (Greiner) mit einem Durchmesser von 15 cm, für den Plaquetest, den Immunofluoreszenztest und die Vermehrungsversuche Zell-

kulturschälchen mit einem Durchmesser von 6 cm verwandt.

Für den Immunofluoreszenztest wurden Deckglas-Zellkulturen hergestellt (pro Zellkulturschälchen zwei Deckgläschen, 12 mm x 32 mm).

3.4. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in einem Schälchen oder auf einem Deckgläschen der 72 Stunden bebrüteten Kükennierenzellkulturen wurden die Zellen eines Schälchens bzw. eines Deckgläschens nach 2-maligem Waschen mit PBS abtrypsiniert (auf 50 ml PBS 1 ml Versen und 0,5 ml Trypsin).

Die Zellen wurden mit Kristallviolett (1 : 10 verdünnt in PBS) angefärbt und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt.

3.5. Vermehrungsuntersuchungen

Die Untersuchungen über die Kinetik der Virusvermehrung wurden auf Kükennieren-Zellkulturen durchgeführt. Die Zellkulturschälchen wurden mit 0,3 ml einer bestimmten Virusverdünnung beimpft. Nach einer Stunde Adsorptionszeit bei Zimmertemperatur wurden die Schälchen zweimal mit warmer PBS (Phosphate Buffered Saline, pro 1 Liter Aqua dest. 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , pH 7,2) gewaschen und mit je 5 ml Erhaltungsmedium (Hanks-Medium, 2 % foetales Kälberserum, 10 % Tryptosephosphat, Antibiotikazusatz) beschickt. Die Bebrütung erfolgte bei $38,5^\circ \text{C}$ und 2 % CO_2 .

Nach bestimmten Zeiten (0, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 h.p.i.) wurde die Virusvermehrung durch Einfrieren jeweils eines Schälchens unterbrochen. Der Inhalt der Zellkulturschälchen wurde nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen

in Zentrifugenröhrchen umgefüllt, kurz (10 sec.) beschallt und bei 3000 UPM, 4° C für 10 Minuten zentrifugiert (Christ, Minifuge). Der Überstand wurde bei - 20° C bis zur Titerbestimmung eingefroren.

Weitere Einzelheiten der Versuchsanordnung werden im Ergebnisteil beschrieben.

3.6. Titrationsmethoden

3.6.1. Indirekter Immunofluoreszenztest (IF-Test)

Zur Titerbestimmung des AAV wurden bestimmte Verdünnungen des jeweiligen AAV-Materials in Earle-Medium hergestellt. Anschließend wurden Kükennieren-Deckglas-Zellkulturen mit 0,2 ml AAV-Material und 0,1 ml Adenovirus (Stamm FAV 1, Titer 10^8 PBE/ml, 1 : 2,5 verdünnt in Earle-Medium) coinfiiziert. Nach 1 Stunde Adsorptionszeit bei 38,5° C und 7 % CO₂ wurden die Zellkulturen mit Erhaltungsmedium überschichtet und bei 38,5° C und 2 % CO₂ für die Dauer von 24 Stunden bebrütet. Die Deckgläschen wurden nach 3-maligem Waschen in PBS 7 Minuten in Azeton fixiert, anschließend luftgetrocknet und danach sofort für den IF-Test verwandt oder bis zur weiteren Bearbeitung bei - 20° C eingefroren.

Zur Markierung des AAV wurden die Deckgläschen mit 1 : 20 in PBS verdünntem AAV-Antikörperhaltigem Kaninchenserum überschichtet. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Deckgläschen dreimal 10 Minuten in PBS auf dem Magnetrührer gewaschen. Sodann wurden die Deckgläschen mit 1 : 40 in PBS verdünntem Konjugat (F.I.T.C. Conjugated Anti-Rabbit IgG from goat, Miles-Laboratories, Israel) beschichtet und wiederum in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Deckgläschen auf Objektträgern in Glyzerinphosphatpuffer (9 Teile Glyzerin, 1 Teil PBS) eingebettet.

Für bestimmte Kontrollen im Laufe der Versuche wurde nach dem gleichen Verfahren ein spezifisches FAV 1-Antiserum vom Kaninchen zum Nachweis von Adenoviren (Stamm FAV 1) eingesetzt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan mit Auflichtfluoreszenz, Leitz, Wetzlar) wurden alle fluoreszierenden Zellen (Kernfluoreszenz) auf der genau markierten Hälfte eines Deckgläschens gezählt. Mit Hilfe der Zellzahl pro Zellkulturschälchen und pro Deckgläschen wurde die Zahl der fluoreszierenden Zellen pro 1 Milliliter Virusausgangsmaterial berechnet und als fluoreszierende-Fokus-bildende-Einheiten pro Milliliter (FFE/ml) angegeben.

3.6.2. Plaquetest

Plaqueteste wurden zur Titerbestimmung der Adenoviren auf Kükennierenzellkulturen durchgeführt. Das Virusmaterial wurde in Zehnerpotenzen in Earle-Medium verdünnt und auf 3 bis 4 Zellkulturschälchen mit je 0,1 ml verimpft. Nach 1 Stunde Adsorptionszeit bei 38,5° C und 7 % CO₂ wurden die Schälchen mit agarhaltigem Medium (43,5 ml Doppelt-Earle-Medium, 10 ml Tryptosephosphatbouillon, 2 ml foetales Kälberserum, Antibiotikazusatz und 0,55 g Agar in 43,5 ml Aqua bidest. gelöst) überschichtet. Die Bebrütungszeit betrug 4 Tage für die Adenovirusstämme FAV 1 und FAV 8 und 5 Tage für den Stamm FAV 5. Danach wurden die Kulturen mit 10-%igem Formalin für 30 Minuten fixiert, das halbfeste Medium entfernt und die Schälchen bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die Plaques wurden ausgezählt und die Plaque-bildenden-Einheiten pro Milliliter (PBE/ml) berechnet.

3.7. Herstellung von Antiseren im Kaninchen

Das AAV-Antikörperhaltige Serum wurde in Kaninchen hergestellt. Gereinigtes AAV wurde 1 : 10 in PBS verdünnt, mit der gleichen Menge von kompletten Freund'schem Adjuvans emulgiert und in der Dosis von 4 ml auf zwei Stellen verteilt subkutan inokuliert. Eine zweite Injektion erfolgte nach 4 Tagen mit der gleichen Dosis intramuskulär. Nach weiteren 12 Tagen erhielten die Tiere erneut eine intramuskuläre Inokulation von 1,6 ml des 1 : 10 verdünnten AAV ohne Adjuvans. Am 10. Tag nach der letzten Impfung wurden die Kaninchen unter Narkose durch Herzpunktion entblutet. Das Serum wurde abzentrifugiert (3000 UPM, Christ, Minifuge) und portionsweise bei -20°C eingefroren.

Das Adenovirus-Antikörperhaltige Serum (Anti-FAV 1-Serum) wurde auf die gleiche Weise wie das Anti-AAV-Serum hergestellt.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

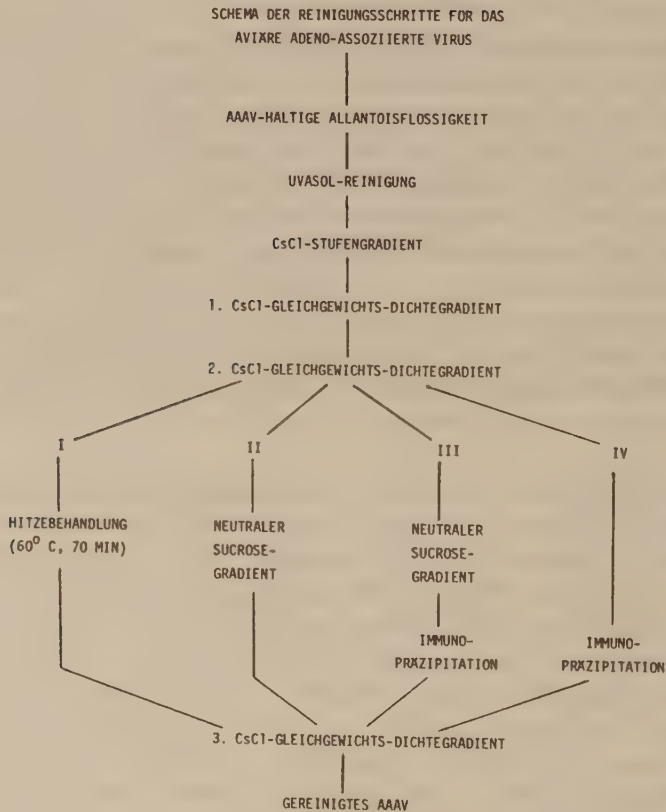
4.1. Reindarstellung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV)

Grundbedingung für die Durchführung von Vermehrungsstudien des AAAV und seiner Helferviren ist der Einsatz von reinem AAAV und reiner Adenovirusstämme. Die verwendeten Adenovirusstämme waren frei von AAAV. Das AAAV mußte jedoch nach seiner Vermehrung in der Allantoishöhle von Hühnerembryonen erst von dem als Helfervirus eingesetzten Adenovirus getrennt werden. Infolge der im Gegensatz zu den humanen Adenoviren (80) hohen Thermostabilität der aviären Adenoviren erwies sich die Trennung von Adeno-assoziiertem Virus und Helfervirus beim aviären System als sehr schwierig. Es wurden daher verschiedene Reinigungsverfahren erprobt und das gereinigte AAAV jeweils auf das Freisein von Helferviren überprüft.

Zunächst wurde die mit Uvasol vorgereinigte AAAV-haltige Allantoisflüssigkeit über einen CsCl-Stufengradienten und zwei CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten konzentriert. Dabei ließ sich das leichte AAAV als Bande mit einer Dichte von $1,39 \text{ g/cm}^3$ und das schwere AAAV als Bande mit einer Dichte von $1,45 \text{ g/cm}^3$ relativ leicht gewinnen. Eine weitere Bande mit der Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ enthielt ebenfalls AAAV-Partikel, desgleichen fanden sich weitere AAAV-Partikel in einer Bande mit der Dichte $1,35 \text{ g/cm}^3$ zusammen mit Adenoviren. Eine Verimpfung der zuletzt genannten Banden (Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,35 \text{ g/cm}^3$) auf Zellkulturen und anschließende Überprüfung im Immunofluoreszenztest ergab, daß es sich hierbei jedoch um nicht-infektiöse AAAV-Partikel handelt.

Nachdem aus dem 2. CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten das leichte und das schwere AAAV getrennt gewonnen werden konnten, wurden zur weiteren Reinigung vier unterschiedliche

Reinigungsverfahren erprobt, über die das folgende Schema einen Überblick gibt.



Das nach den verschiedenen Methoden gereinigte AAAV wurde auf seine Reinheit, insbesondere auf das Freisein von Helfervirus überprüft. Hierzu wurde das unverdünnte gereinigte AAAV-Material auf Kükennierenzellkulturen verimpft, die ohne Zugabe von

Helfervirus 24 Stunden bebrütet wurden. Die Präparate wurden wie üblich fixiert und im Immunofluoreszenztest unter Anwendung eines FAV 1-Antiserums vom Kaninchen auf Verunreinigungen mit Helfervirus getestet. Dabei zeigten die Reinigungsverfahren I bis IV unterschiedliche Ergebnisse.

Die Reinigung des AAAV über eine Reihe von CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten, kombiniert mit einer Hitzebehandlung (im Schema unter I dargestellt) genügte nicht, um das AAAV vom Helfervirus zu trennen. Wurde das AAAV nach den drei übrigen Reinigungsverfahren (im Schema unter II bis IV dargestellt) behandelt, so wurden bei der Überprüfung im Immunofluoreszenztest keine Adenoviren gefunden.

Um diese Ergebnisse weiter zu sichern, wurde das AAAV-Material, ebenfalls ohne Zugabe von Helfervirus, zunächst in die Allantoishöhle von 11 Tage bebrüteten Hühnerembryonen verimpft. 5 Tage nach der Infektion wurde die Allantoisflüssigkeit geerntet und nach Infektion von Kükennierenzellen im IF-Test auf Adenoviren (FAV 1) getestet. Das über eine Reihe von CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten und einen neutralen Sucrose-Gradienten gereinigte AAAV (im Schema unter II dargestellt) zeigte nach dieser Überprüfung, daß das Helfervirus nicht vollständig entfernt werden konnte. Der Nachweis von Adenoviren verlief positiv. Ein Nachweis von Adenoviren gelang jedoch nicht aus den beiden Präparationen (im Schema unter III und IV dargestellt), die mit einer Immunopräzipitation, mit oder ohne Sucrose-Gradient, durchgeführt wurden.

Zur Sicherheit wurden diese Präparationen noch weiter überprüft. Die Allantoisflüssigkeit der 1. Embryopassage wurde dreimal weiter über Hühnerembryonen passagiert. Nach jeder Passage erfolgte, wie oben beschrieben, eine Überprüfung im IF-Test. Die Ergebnisse der IF-Teste zeigten, daß die im Schema unter III und IV dargestellten Reinigungsverfahren geeignet waren, das AAAV vollständig von dem Helfervirus zu

trennen. Somit stand für die Untersuchungen zur Vermehrungskinetik ein völlig gereinigtes aviäres Adeno-assoziiertes Virus zur Verfügung.

Der neutrale Sucrose-Gradient, der besonders bei der Reindarstellung des leichten AAAV durchgeführt wurde, konnte im Verlauf der Versuche entfallen, da er sich nicht als notwendig erwies, und so der Reinigungsvorgang des AAAV verkürzt werden konnte. Die Abbildung 1 vermittelt einen Eindruck von den gereinigten AAAV-Präparationen. Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchung danke ich Herrn Dr. H. Gelderblom, Robert-Koch-Institut.

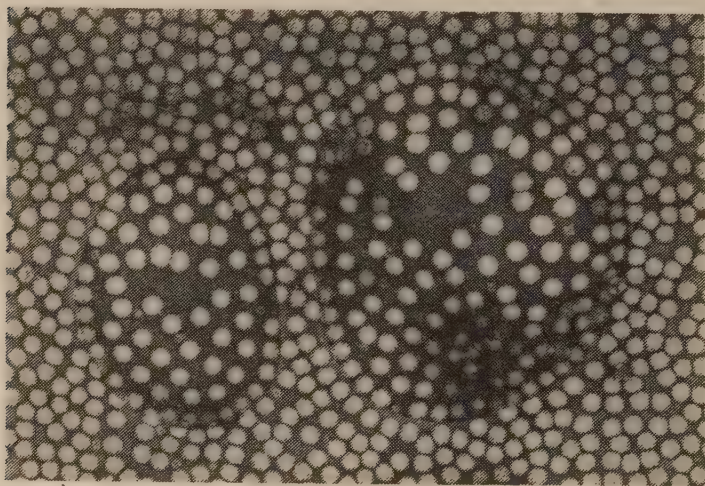


Abb. 1

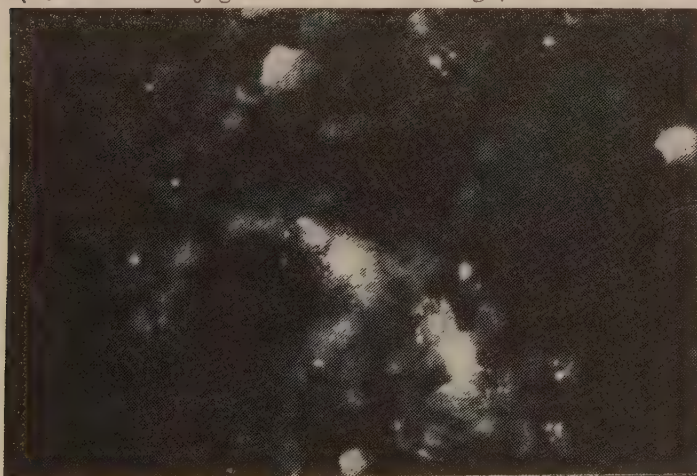
Gereinigte Präparation vom aviären Adeno-assoziierten Virus nach Negativkontrastierung. Vergr.: $60 \times 10^3 \times 2,3$ -fach.

(Aufnahme Dr. Gelderblom)

4.2. Bestimmung der Infektiosität des AAV mit Hilfe der Immunofluoreszenz

Die Ermittlung einer geeigneten Methode zur korrekten Quantifizierung der Infektiosität war grundlegend für alle Untersuchungen zur Vermehrung dieses Virus. Eine Titerbestimmung mit dem gebräuchlichen Plaquetest ist nicht möglich, da das AAV keinen zytopathischen Effekt und somit keine Plaquebildung auslöst.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde ein indirekter Immunofluoreszenztest erarbeitet, der sich zur Titerbestimmung des AAV als geeignet erwies. Für den Test wurden Kükennieren-Deckglas-Zellkulturen mit AAV und Helfervirus beimpft. Für die infizierten Zellen wurde eine Bebrütungszeit von 24 Stunden gewählt. Vorversuche hatten gezeigt, daß bei einer längeren Bebrütungszeit bereits eine Zerstörung der Kükennierenzellen infolge der fortschreitenden Vermehrung der Adenoviren eintritt. Nach dem Fixieren wurden die beimpften Nierenzellen-Deckglas-Kulturen mit einem spezifischen AAV-Antiserum vom Kaninchen überschichtet und anschließend mit Konjugat (F.I.T.C. Conjugated Anti-Rabbit IgG) markiert.



Mit aviären Adeno-assoziierten Viren infizierte Kükennierenzellkulturen, 24 h.p.i.. Deutliche Kernfluoreszenz mit staubförmiger Fluoreszenz im kernnahen Zytoplasma.

Abb. 2, Vergr. 200fach

Abbildung 2 zeigt AAAV-infizierte Zellen mit einer ausgeprägten Kernfluoreszenz sowie einer geringeren staubartigen Fluoreszenz im Zytoplasma in Kernnähe. Auf der Abbildung lassen sich deutlich vier fluoreszierende Zellen erkennen. Die Kernfluoreszenz dieser AAAV-positiven Zellen hebt sich gut von den negativen nicht fluoreszierenden Zellen der Umgebung ab, sodaß eine Auszählung der infizierten Zellen möglich ist.

Bei jedem IF-Test wurden Kontrollen durchgeführt, indem auch unbeimpfte Kükennierenzellkulturen mit Hilfe eines AAAV-Antiserums und eines FAV 1-Antiserums auf eine eventuelle Verunreinigung mit diesen Viren überprüft wurden. Zur Kontrolle wurde auch das CELO-Virus (FAV 1), das im IF-Test als Helfervirus eingesetzt wurde, bei jedem Testansatz erneut unter Anwendung des FAV 1-Antiserums auf seine Funktion überprüft.

Für die Titerbestimmung wurden die Präparate herangezogen, bei denen beim Auszählen die Zahl der fluoreszierenden Zellen auf der Hälfte eines Deckgläschens zwischen 20 und 100 lag. Für einen Wert der Vermehrungskurve wurden 6 Deckgläschen beimpft und aus der Zahl der fluoreszierenden Zellen pro 1/2 Deckgläschen der Mittelwert gebildet.

Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde durch Wiederholungen der IF-Teste bzw. einzelner Vermehrungskurven immer wieder bestätigt.

4.3. Vermehrungszyklen des AAAV und seiner Helferviren

Untersuchungen zur Vermehrung des AAAV und seiner Helferviren erfolgten nach der unter 3.5. beschriebenen Methode auf Kükennierenzellkulturen. Als Stunde 0 nach der Infektion wurde der Zeitpunkt des Bebrütungsbeginns nach einer Stunde Adsorptionszeit angesehen. Zu den bestimmten Zeiten wurde die Virusvermehrung durch Einfrieren der Zellkulturschälchen unterbrochen.

Das folgende zweimalige Auftauen und Einfrieren bewirkte eine Ablösung des Zellrasens vom Boden der Schälchen. Durch eine Ultraschallbehandlung wurde das intrazelluläre Virus freigesetzt. Die Virustiter setzten sich somit aus intra- und extrazellulärem Virus zusammen. Gemessen wurden die jeweiligen Titer des AAAV mit dem Immunofluoreszenztest und die Titer der Helferviren mit dem Plaquetest.

Um die Vermehrung der Viren und ihre gegenseitige Beeinflussung deutlich zu machen, wurden die Verläufe der AAAV-Vermehrung, der Vermehrung des Helfervirus und gleichzeitig der Vermehrung des Helfervirus ohne Einfluß des AAAV in jeweils einer Graphik zusammengefaßt. Die unter 3.3.1. bis 3.3.4. beschriebenen Versuche wurden alle mit der leichten Fraktion des AAAV durchgeführt.

Die einzelnen Kombinationen mit hoher und niederer Multiplizität des AAAV und der Helferviren werden im Folgenden gesondert behandelt.

4.3.1. Vermehrungszyklen von AAAV und Helferviren nach Beimpfung mit einer gleichen Multiplizität von 10

In einem ersten Vermehrungsversuch wurde für alle eingesetzten Virusstämme eine gleiche Infektionsdosis für die Kulturen gewählt. Sowohl das AAAV als auch die Adenovirusstämme FAV 1, FAV 5 und FAV 8 wurden mit einer Multiplizität (MOI) von 10 verimpft. Die Auswertung dieser Vermehrungsuntersuchungen wurde in den Abbildungen 3 bis 5 dargestellt.

Bei der Vermehrung des AAAV zeigte sich eine Latenzzeit von 8 Stunden, der eine exponentielle Vermehrungsphase über 4 bis 4,5 log-Stufen folgte. 20 bis 24 Stunden nach der Infektion war der Höhepunkt der AAAV-Vermehrung erreicht, die Vermehrungskurven zeigten nur einen geringfügigen weiteren Anstieg.

Im Gegensatz zu den Adeno-assoziierten Viren zeigten die Adenovirusstämme FAV 1 (Abb. 3) und FAV 5 (Abb. 4) eine etwas längere Latenzzeit von 12 Stunden, während bei dem Virusstamm FAV 8 (Abb. 5) schon nach 12 Stunden ein höherer Titer feststellbar war. Alle drei Adenovirusstämme wiesen nach der Latenzzeit im Vergleich zum AAV zunächst nur einen geringen Anstieg der Vermehrungskurven auf, die exponentielle Vermehrungsphase begann später und verlief über 3,5 log-Stufen, um bei FAV 1 und FAV 8 nach ungefähr 24 h.p.i. zu enden. Danach war nur noch eine geringe Adenovirusvermehrung zu verzeichnen. Die exponentielle Vermehrungsphase des FAV 5 dauerte länger. Dies zeigte sich auch bei den weiteren Vermehrungsversuchen mit dem FAV 5 und ist darauf zurückzuführen, daß dieser Adenovirusstamm einen geringeren zytopathischen Effekt auf die Wirtszellen ausübt und so die Virusvermehrung sowohl des FAV 5 als auch des AAV über einen längeren Zeitraum ablaufen kann.

Eine Beeinflussung der Vermehrung der Adenoviren durch das AAV konnte bei den Stämmen FAV 1 und FAV 8 nicht festgestellt werden. Die Vermehrungskurven dieser beiden Adenovirusstämme (Abb. 3, Abb. 5) als Helfer wie auch ohne AAV verliefen nahezu identisch. Bei der Vermehrung des Adenovirusstammes FAV 5 (Abb. 4) zeigte die Vermehrungskurve des Helfervirus in Anwesenheit des AAV jedoch einen etwas flacheren Verlauf. Eine leichte Verzögerung war bei diesem Virusstamm als Helfervirus im Vergleich zu der FAV 5-Vermehrungskurve ohne AAV deutlich erkennbar.

Insgesamt konnte für diese Versuche festgestellt werden, daß die Bedingungen für eine Ein-Schritt-Vermehrung für die beiden Virusarten erreicht werden konnten.

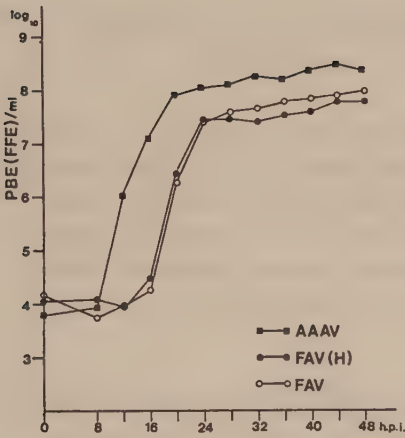


Abb. 3

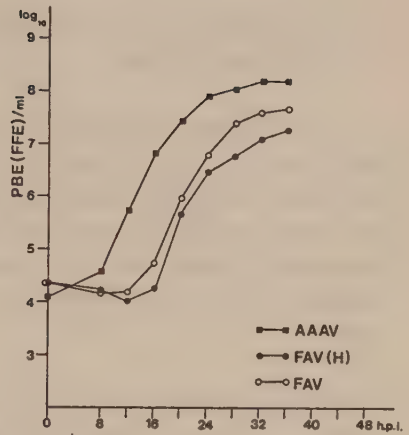


Abb. 4

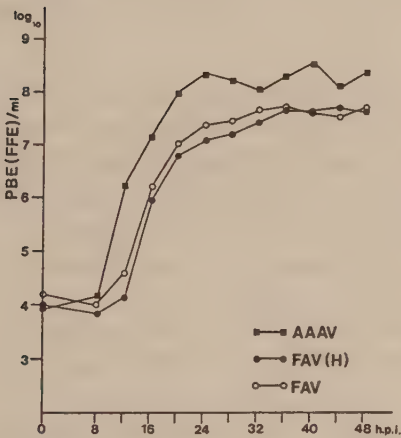


Abb. 5

Abb. 3 - 5: Verlauf der Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und der Helferviren (FAV) nach Beimpfung der Zellen mit gleicher Multiplizität von $MOI = 10$ bei allen Virusstämmen.

Abb. 3: AAAV und FAV 1

Abb. 4: AAAV und FAV 5

Abb. 5: AAAV und FAV 8

Folgende Bezeichnungen werden in allen Abbildungen übernommen:

AAAV: Vermehrungsverlauf des aviären Adeno-assoziierten Virus.

FAV (H): Vermehrungsverlauf der aviären Adenoviren als Helfer.

FAV: Vermehrungsverlauf der aviären Adenoviren ohne AAAV.

4.3.2. Vermehrung des AAAV nach Infektion mit niedriger Multiplizität

Aus der im ersten Versuch festgestellten Ein-Schritt-Vermehrung ergab sich die Frage, ob die Vermehrung des AAAV auch bei geringen Multiplizitäten ermöglicht wird und inwieweit sich eine geringere AAAV-MOI auf die AAAV-Vermehrung auswirkt. Gleichzeitig sollten diese Versuche Auskunft darüber geben, welchen Einfluß die Helferviren auf die AAAV-Vermehrung ausüben.

Die Versuche wurden mit einer AAAV-Multiplizität von 1 durchgeführt. Für die Adenovirusstämme FAV 5 und FAV 8 wurde eine MOI von 10 und für den Stamm FAV 1 eine MOI von 24 gewählt. Die Ergebnisse dieser Vermehrungsversuche sind in den Abbildungen 6 bis 8 wiedergegeben.

In allen Fällen war deutlich festzustellen, daß das AAAV auch bei dieser geringen MOI eine Ein-Schritt-Vermehrung aufwies. Ebenso wurde die in den vorhergegangenen Versuchen ermittelte Latenzzeit des AAAV von 8 Stunden nicht durch die niedrigere AAAV-Infektion beeinflußt. Auch die weiteren Vermehrungsphasen des AAAV zeigten kaum Abweichungen in ihrem Verlauf von den Ergebnissen der ersten Versuche (Abb. 3 - 5). Die AAAV-Vermehrungskurven mit der MOI von 1 verliefen lediglich um ungefähr 1 log-Stufe unter den Kurven mit der MOI von 10.

Die Vermehrung der Adenoviren verlief nicht wesentlich anders als in den vorhergegangenen Versuchen. Die CELO-Virus-Vermehrungskurve mit der höheren MOI von 24 (Abb. 6) verlief insgesamt um etwa 1 log-Stufe höher als die entsprechende Vermehrungskurve mit der MOI von 10 (Abb. 3).

Auch bei diesen Vermehrungsversuchen zeigte sich keine Beeinflussung der Adenoviren FAV 1 und FAV 8 durch das AAAV, während der FAV 5 (Abb. 7), wie schon im vorhergegangenen Versuch

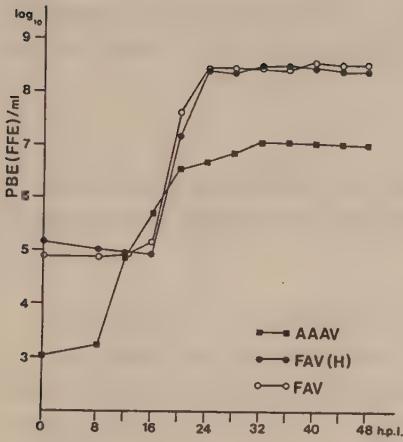


Abb. 6

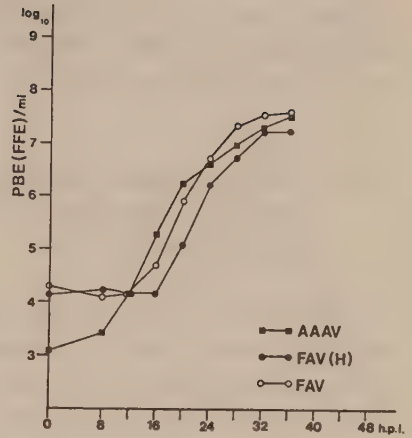


Abb. 7

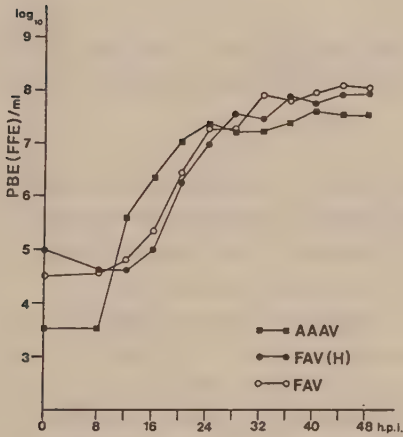


Abb. 8

Abb. 6 - 8: Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und der aviären Adenoviren (FAV) bei geringer Multiplizität des AAAV.

Die Beimpfung der Kulturen wurde wie folgt durchgeführt:

Abb. 6: AAAV mit MOI = 1 und FAV 1 mit MOI = 24.

Abb. 7: AAAV mit MOI = 1 und FAV 5 mit MOI = 10.

Abb. 8: AAAV mit MOI = 1 und FAV 8 mit MOI = 10.

(Abb. 4) beobachtet, eine leichte Verzögerung seiner Vermehrung durch die Anwesenheit des AAAV, selbst bei dieser geringen MOI des AAAV, aufwies.

4.3.3. Vermehrungsuntersuchungen nach Infektion mit höherer Multiplizität des AAAV und einer geringen Multiplizität der Helferviren

In den folgenden Untersuchungen (Abb. 9 bis 11) wurde das AAAV mit hoher, die Helferviren hingegen nur mit geringer Multiplizität eingesetzt. Hierzu wurden die Adenovirusstämme FAV 1 und FAV 5 mit einer MOI von 1 und der Stamm FAV 8 mit einer MOI von 2 verimpft. Die MOI des AAAV betrug 10 (Abb. 10), 20 (Abb. 11) und 40 (Abb. 9).

Zunächst war festzustellen, daß die Bedingungen für eine Einschnitt-Vermehrung auch bei diesen Vermehrungsversuchen noch eingehalten wurden.

Die Vermehrung des AAAV wies eine etwas verlängerte Latenzzeit auf. Bei den bisher durchgeführten Vermehrungsversuchen betrug die Latenzzeit des AAAV 8 Stunden. Hier zeigte sich, daß sich die Latenzzeit auf 12 bis 16 Stunden verlängern kann, wenn die Helferviren in nur geringer Konzentration vorhanden sind (Abb. 9, 11). Der weitere Verlauf der AAAV-Vermehrung verhielt sich genauso, wie bei den bisherigen Vermehrungsversuchen. Auffallend war wiederum die schon beschriebene länger andauernde Vermehrungsphase, sowohl des AAAV als auch des Helfervirus, wenn der Adenovirusstamm FAV 5 eingesetzt wurde (Abb. 10).

Alle drei Adenovirusstämme zeigten im Verlauf ihrer Vermehrung eine geringe Verzögerung durch die Gegenwart des AAAV.

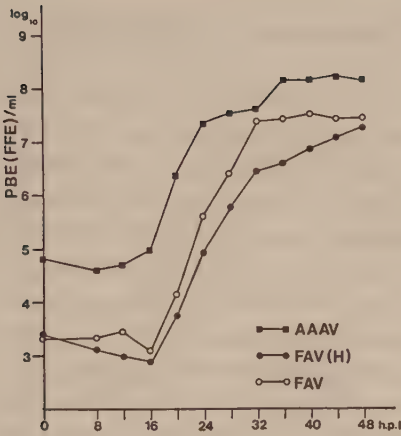


Abb. 9

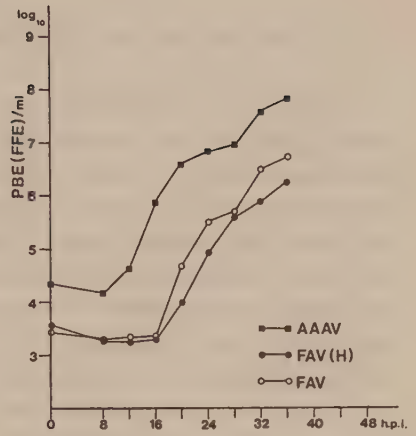


Abb. 10

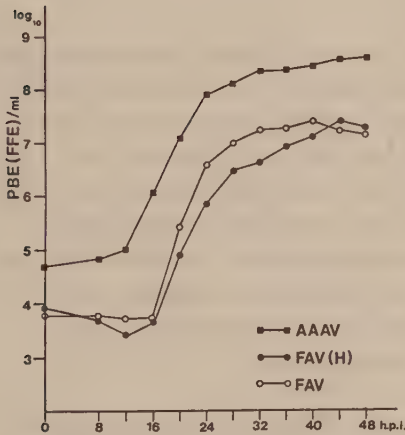


Abb. 11

Abb. 9 - 11: Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und der aviären Adenoviren (FAV) bei höherer Multiplizität des AAAV.

Die Beimpfung der Kulturen wurde wie folgt durchgeführt:

Abb. 9: AAAV mit MOI = 40 und FAV 1 mit MOI = 1.

Abb. 10: AAAV mit MOI = 10 und FAV 5 mit MOI = 1.

Abb. 11: AAAV mit MOI = 20 und FAV 8 mit MOI = 2.

4.3.4. Einfluß des AAAV auf die Vermehrung der Helferviren

Die bisherigen Ergebnisse der Vermehrungsversuche ließen vermuten, daß das AAAV besonders auf die Vermehrung des Adenovirusstammes FAV 5 einen Einfluß ausübt. Aber auch die Adenovirusstämme FAV 1 und FAV 8 zeigten unter bestimmten Bedingungen eine Verzögerung ihrer Vermehrung durch die Anwesenheit des AAAV. Aufgrund der in den Abbildungen 9 und 11 aufgezeigten Vermehrungsversuche schien das AAAV erst in höherer Konzentration die Vermehrung der Adenovirusstämme FAV 1 und FAV 8 zu beeinflussen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde in den folgenden Vermehrungsversuchen die Multiplizität des AAAV weiter erhöht. Als Helfervirus wurde der Stamm FAV 1 mit einer MOI von 1 eingesetzt. Die MOI des AAAV betrug 25 (Abb. 12), 50 (Abb. 13) und 100 (Abb. 14).

Es ließ sich deutlich erkennen, daß bei diesen Untersuchungen die Vermehrung des AAAV verzögert ablief. Die Latenzzeit lag bei 12 Stunden, die anschließende Vermehrungsphase des AAAV verlief mit steigender MOI flacher. Besonders auffallend war der Verlauf der Vermehrungskurve des AAAV in Abb. 14. Die MOI des AAAV betrug hierbei 100, und man konnte kaum noch von einer eigentlichen Vermehrungskurve sprechen, da der Zuwachs der Kurve sehr gering war, und eine exponentielle Vermehrungsphase des AAAV allenfalls zwischen 16 und 24 Stunden nach der Infektion zu erkennen war.

Der Verlauf der Vermehrung des FAV 1 bestätigte die aufgrund der vorhergegangenen Versuche aufgestellte Vermutung, daß das AAAV einen Einfluß auf die Vermehrung seines Helfervirus ausübt. Die Abbildungen 12, 13 und 14 zeigen, daß die CELO-Virus-Vermehrungskurven umso verzögerter und flacher verliefen, je größer die MOI des anwesenden AAAV war. Daraus war zu folgern, daß das AAAV, zumindest bei höherer Multiplizität einen hemmenden Einfluß auf die Adenovirusvermehrung auszuüben vermag.

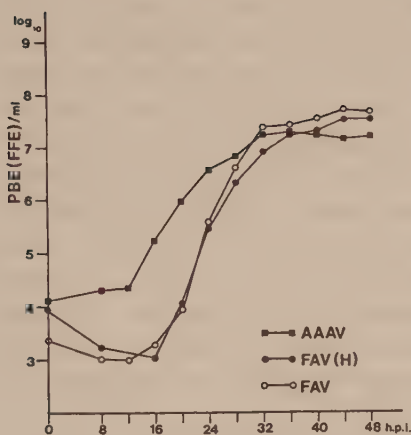


Abb. 12

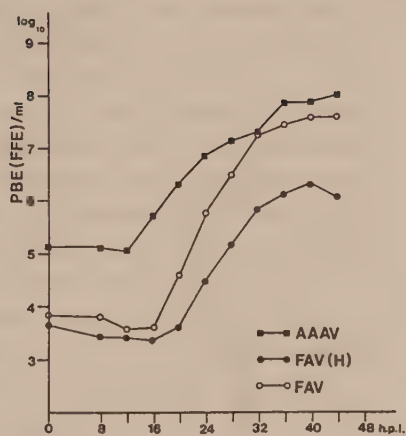


Abb. 13

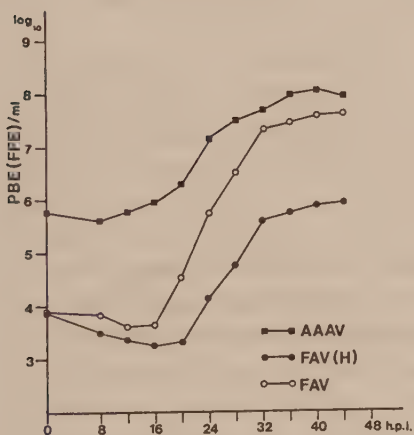


Abb. 14

Abb. 12 - 14: Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und des aviären Adenovirus FAV 1 bei steigender Multiplizität des AAAV.

Die Beimpfung der Kulturen wurde wie folgt durchgeführt:

Abb. 12: AAAV mit MOI = 25 und FAV 1 mit MOI = 1.

Abb. 13: AAAV mit MOI = 50 und FAV 1 mit MOI = 1.

Abb. 14: AAAV mit MOI = 100 und FAV 1 mit MOI = 1.

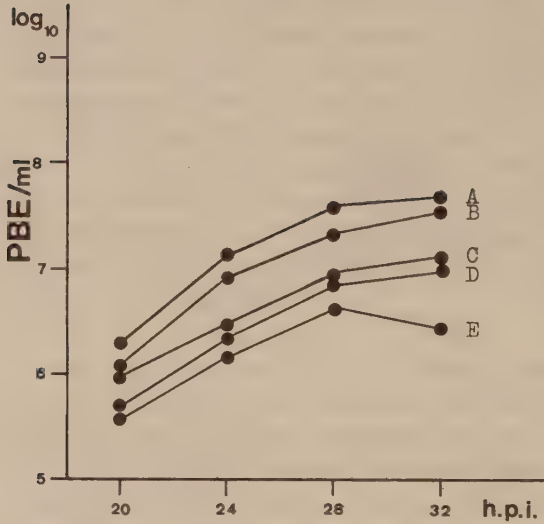


Abb. 15

Abb. 15: Hemmung der Vermehrung des aviären Adenovirus FAV 5 in einem Zeitraum von 20 bis 32 Stunden nach der Infektion durch steigende Infektionsdosis vom aviären Adeno-assoziierten Virus. Der FAV 5 wurde mit einer MOI von 7 verimpft.

Vermehrung des FAV 5: A ohne Zugabe von AAAV
B mit AAAV, MOI = 1
C mit AAAV, MOI = 12
D mit AAAV, MOI = 30
E mit AAAV, MOI = 60

Diese Ergebnisse wurden auch durch Vermehrungsversuche mit dem Adenovirusstamm FAV 5 bestätigt. Abbildung 15 zeigt Ausschnitte verschiedener Vermehrungsversuche mit dem FAV 5 als Helfervirus. Die MOI des FAV 5 betrug dabei immer 7, während die MOI des AAV in steigender Konzentration folgendermaßen gewählt wurde: Kurve A: FAV 5-Vermehrung ohne AAV-Gegenwart, Kurven B bis E: FAV 5-Vermehrung in Gegenwart von AAV mit einer MOI von 1 (Kurve B), einer MOI von 12 (Kurve C), einer MOI von 30 (Kurve D) und einer MOI von 60 (Kurve E). Das Ergebnis dieser Vermehrungsversuche zeigte deutlich, daß das AAV mit steigender Multiplizität einen immer stärker hemmenden Einfluß auf die Adenovirusvermehrung ausübte.

4.3.5. Vermehrung des AAV nach Infektion mit der schweren AAV-Fraktion

Die bisherigen Untersuchungen wurden alle mit der leichten Fraktion (Dichte $1,39 \text{ g/cm}^3$) des gereinigten AAV durchgeführt. Bei der Darstellung dieses Virus ließ sich aber, wie bereits unter 4.1. erwähnt, auch eine schwere Fraktion mit einer größeren Dichte (Dichte $1,45 \text{ g/cm}^3$) gewinnen. PRONOVOST et al. (47) konnten in ihren Untersuchungen mit der leichten und der schweren Fraktion feststellen, daß neben einer Hemmung von Adenoviren sowohl durch die leichte als auch durch die schwere AAV-Fraktion, die schwere Fraktion des AAV unter bestimmten Bedingungen auch eine Förderung der als Helfer eingesetzten Adenoviren bewirken konnte. Die im Folgenden durchgeführten Vermehrungsversuche mit der schweren Fraktion des AAV sollten eventuelle Unterschiede zu den Ergebnissen der Vermehrungsversuche mit der leichten AAV-Fraktion aufzeigen.

Die Ausbeute des schweren AAV nach Abschluß der Reinigung war wesentlich geringer als die des leichten AAV. Der Titer des schweren AAV lag mit etwa 5×10^8 FFE/ml um eine 10er Potenz unter dem Titer des leichten AAV (Titer etwa 5×10^9

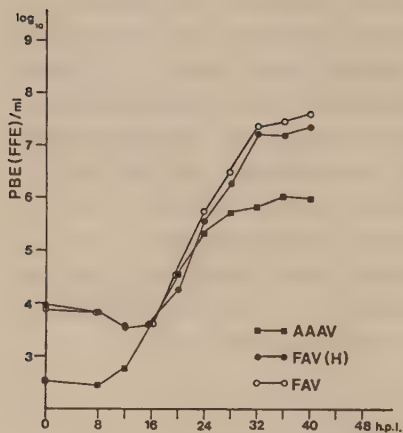


Abb. 16

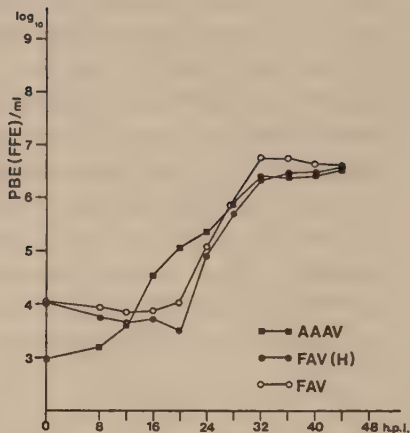


Abb. 17

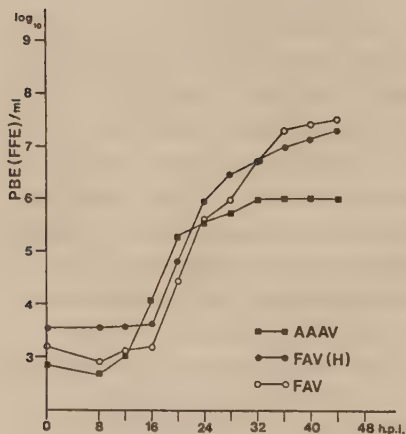


Abb. 18

Abb. 16 - 18: Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und der aviären Adenoviren (FAV) nach Infektion mit der schweren AAAV-Fraktion.

Die Beimpfung der Kulturen wurde wie folgt durchgeführt:

Abb. 16: Schweres AAAV mit MOI = 1 und FAV 1 mit MOI = 1.

Abb. 17: Schweres AAAV mit MOI = 1 und FAV 5 mit MOI = 1.

Abb. 18: Schweres AAAV mit MOI = 1 und FAV 8 mit MOI = 1.

FFE/ml). Aus diesem Grund konnten alle Vermehrungsversuche mit der schweren Fraktion des AAV nur mit einer Multiplizität von 1 durchgeführt werden.

Zunächst wurden Vermehrungsversuche angesetzt, bei denen die MOI der Helferviren und die MOI des schweren AAV gleichermaßen 1 betrug. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in den Abbildungen 16, 17 und 18 wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß die Vermehrungskurven des AAV hierbei sehr flach verliefen, vor allem bei FAV 5 (Abb. 17). Die Latenzzeit war nicht verlängert, der Gipfelpunkt wurde jedoch um 4 bis 8 Stunden später erreicht. Die Vermehrungsrate lag etwas niedriger. Die Ursache hierfür könnte nicht zuletzt in der geringen Animpfdosis der Helferviren liegen.

Die Vermehrungskurven der drei Helferviren zeigten eine ausge dehnte Latenzzeit von 16 (Abb. 16, 18) bis 20 (Abb. 17) Stunden. Im Verlauf ihrer Vermehrung zeigten die Stämme FAV 1 und FAV 8 keine Beeinflussung durch das AAV. Selbst der Adenovirusstamm FAV 5 wurde in seiner Vermehrung nur äußerst gering durch die Anwesenheit des AAV gehemmt.

In weiteren Versuchen wurde die Multiplizität des Helfervirus erhöht. Eine höhere Dosierung des schweren AAV konnte aus den schon genannten Gründen dabei allerdings nicht vorgenommen werden. Die Abbildungen 19 bis 21 geben die Ergebnisse dieser Versuche wieder. Die Bedingungen für eine Ein-Schritt-Vermehrung wurden hierbei von allen eingesetzten Virusarten erfüllt. Die Vermehrung des Adenovirusstammes FAV 8 wurde durch die Anwesenheit des AAV geringfügig gehemmt.

Allgemein läßt sich über diese mit der schweren Fraktion des AAV durchgeführten Vermehrungsversuche sagen, daß sie gegenüber den Versuchen mit dem leichten AAV keine neuen Ergeb-

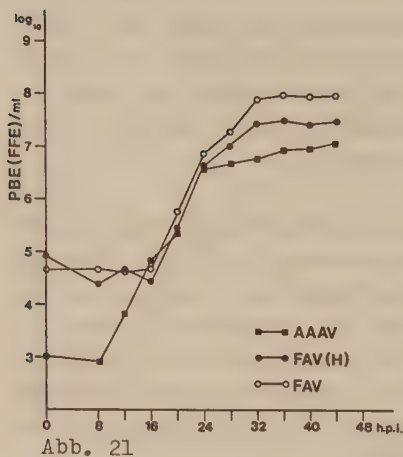
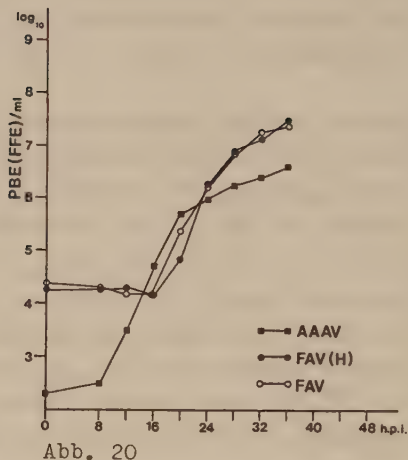
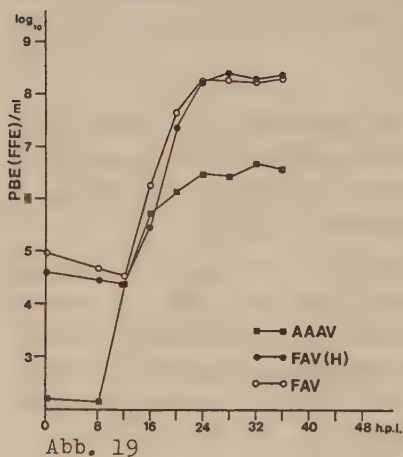


Abb. 19 - 21: Vermehrung des aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und der aviären Adenoviren (FAV) nach Infektion mit der schweren AAAV-Fraktion und mit höherer Multiplizität der Helfer-viren.

Die Beimpfung der Kulturen wurde wie folgt durchgeführt:

Abb. 19: Schweres AAAV mit $MOI = 1$ und FAV 1 mit $MOI = 20$.

Abb. 20: Schweres AAAV mit $MOI = 1$ und FAV 5 mit $MOI = 10$.

Abb. 21: Schweres AAAV mit $MOI = 1$ und FAV 8 mit $MOI = 10$.

nisse erbrachten. Insbesondere trat keine Erhöhung der Helfer-virusproduktion durch die Gegenwart des AAAV in Erscheinung, und auch die Hemmung des FAV 5 (Abb. 17) und des FAV 8 (Abb. 21) bestätigten die Ergebnisse der mit der leichten Fraktion des AAAV durchgeführten Vermehrungsversuche.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Vermehrungsstudien war die Gewinnung reiner Virusstämme Voraussetzung. Die aviären Adenovirusstämme FAV 1, FAV 5 und FAV 8 waren nach der vorausgegangenen Klonung frei von aviären Adeno-assoziierten Viren, wie entsprechende Prüfungen immer wieder bestätigten. Die Virusstämme ließen sich ohne Schwierigkeiten auf Küken-nierenzellkulturen vermehren. Das aviäre Adeno-assoziierte Virus wurde in der Allantoishöhle von embryonierten Hühner-eiern vermehrt, dabei wurde der aviäre Adenovirusstamm FAV 1 (Stamm CELO-Phelps) als Helfervirus eingesetzt. Um aus der virushaltigen Allantoisflüssigkeit das AAAV zu gewinnen, mußte ein geeignetes Reinigungsverfahren durchgeführt werden, welches vor allem sicherstellte, daß das gereinigte AAAV frei von dem zu seiner Vermehrung benötigten Helfervirus war. Dazu wurden unterschiedliche Reinigungsverfahren versucht und überprüft.

Eine Reinigung des AAAV über mehrere CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten, wie sie von YATES et al. (81) in Anlehnung an die von LAVER et al. (48) beschriebene Technik durchgeführt wurde, erwies sich bei den vorliegenden Untersuchungen als nicht ausreichend, um das AAAV vollständig von seinem Helfervirus zu trennen. Auch eine zusätzliche Hitzebehandlung des AAAV-haltigen Kulturmateri als zur Inaktivierung der Adenoviren, wie sie zur Reindarstellung der humanen Adeno-assoziierten Viren eingesetzt wird (11, 79), ist aufgrund der hohen Hitze-stabilität der aviären Adenoviren (5) nicht geeignet. Nach einer Verimpfung des auf diesem Wege gereinigten AAAV-Materi als auf Küken-nierenzellkulturen und einer Bebrütungszeit von 24 Stunden konnte mit Hilfe des IF-Testes immer noch eine Rest-infektiosität der Adenoviren nachgewiesen werden. Einen etwas

besseren Reinigungsgrad des AAAV konnte eine Kombination von CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten und einem neutralen Sucrose-Gradienten, wie auch von DE LA MAZA und CARTER (60) beschrieben, erzielen. Wurde diese Präparation jedoch über eine Eipassage und anschließend nach Verimpfung der Allantoisflüssigkeit auf Kükennierenzellkulturen im IF-Test geprüft, so konnten Adenoviren erneut nachgewiesen werden. Auch diese Reinigungsmethode genügte demnach nicht, den für die Vermehrungsstudien erforderlichen Reinigungsgrad zu erzielen.

Es wurde daher ein Reinigungsverfahren versucht, in dem neben mehreren CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten eine Bindung der Adenoviren durch einen spezifischen Antikörper vom Kaninchen (Immunopräzipitation) angewandt wurde. Da zwischen dem aviären Adeno-assoziierten Virus und seinem Helfervirus keine antigene Verwandtschaft besteht, konnte durch diese Methodik, die auch schon von PRONOVOST et al. (69) erfolgreich angewandt wurde, ein gereinigtes AAAV gewonnen werden, daß auch nach mehreren Eipassagen keine Verunreinigungen mit Adenoviren erkennen ließ. Ein zunächst noch besonders für das leichte AAAV angewandter neutraler Sucrose-Gradient konnte entfallen, nachdem nachgewiesen werden konnte, daß die übrigen Reinigungsschritte schon die Gewinnung eines Helfervirus-freien AAAV garantieren.

Damit erwies sich die Reinigung des AAAV über mehrere CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten, kombiniert mit einer Immunopräzipitation, als eine günstige und gut reproduzierbare Methode. Sie wurde für die Reindarstellung des aviären Adeno-assoziierten Virus bei allen Vermehrungsversuchen verwandt.

Das infektiöse AAAV befand sich bei den vorliegenden Untersuchungen immer in den Banden mit der Dichte $1,39 \text{ g/cm}^3$ (leichtes AAAV) und $1,45 \text{ g/cm}^3$ (schweres AAAV). Dies entspricht in etwa den Angaben von YATES et al. (81) und

PRONOVOST et al. (69) über die verschiedenen Dichtebereiche der AAAV-Partikel. Sie geben für das leichte AAAV eine Dichte von $1,38 \text{ g/cm}^3$ bzw. $1,39 \text{ g/cm}^3$ und für das schwere AAAV eine Dichte von $1,42 \text{ g/cm}^3$ an. Auch die Angaben über die Dichtebereiche der humanen leichten und schweren Adeno-assoziierten Viruspartikel bewegen sich in diesen Bereichen (42, 46, 60, 86).

Neben den leichten und schweren AAAV-Partikeln konnten auch noch AAAV-Partikel geringerer Dichte ($1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,35 \text{ g/cm}^3$) isoliert werden, die sich jedoch als nicht-infektiös erwiesen. Auch dieser Befund entspricht den Angaben von YATES et al. (81), der für die nicht-infektiösen AAAV-Partikel eine Dichte von $1,34 \text{ g/cm}^3$ angibt.

Der Anteil des leichten AAAV war in allen Versuchen wesentlich größer als der des schweren AAAV. Der Titer des leichten AAAV mit 5×10^9 FFE/ml lag um eine 10er Potenz über dem Titer des schweren AAAV (Titer 5×10^8 FFE/ml). Dies stimmt überein mit Angaben von DE LA MAZA und CARTER (60), die in ihren Untersuchungen über das humane AAV Typ 2 feststellten, daß das leichte AAV gegenüber dem schweren AAV eine 16mal höhere Infektiosität aufweist. Im Gegensatz zu unseren Befunden halten jedoch YATES et al. (81) die Anzahl der infektiösen Partikel in der schweren Fraktion des aviären Adeno-assoziierten Virus für wesentlich höher als in der leichten.

Die relativ geringe Ausbeute von schwerem AAAV und der große Reinigungsaufwand waren die Ursache, daß bei den späteren Vermehrungsversuchen mit dem schweren AAAV höhere Multiplizitäten als 1 bei der Infektion nicht eingesetzt werden konnten.

Zur Titerbestimmung des aviären Adeno-assoziierten Virus wurde ein indirekter Immunofluoreszenztest angewandt. Dazu wurde das AAAV-Material auf Kükennieren-Deckglas-Zellkulturen verimpft und nach einer 24stündigen Bebrütungszeit der Titer bestimmt. In einer Reihe von Vorversuchen hatte sich eine Bebrütungszeit der infizierten Zellkulturen von 24 Stunden als optimal herausgestellt. In dieser Zeit läuft der Vermehrungszyklus des AAAV soweit, daß die einzelnen AAAV-infizierten Zellen eine deutliche Fluoreszenz zeigen. Eine längere Bebrütungszeit führt zu einer sekundären Ausbreitung des AAAV auf die Nachbarzellen und es entstehen Herdbildungen von fluoreszierenden Zellen, die eine genaue Titerbestimmung erschweren bzw. unmöglich machen. Diese Methode ermöglicht eine exakte und reproduzierbare Titerbestimmung des AAAV, bei der die Infektiosität gemessen wird.

Die Titerbestimmung der aviären Adenoviren erfolgte in dem üblichen Plaquetest. Dabei zeigte sich, daß für die Stämme FAV 1 und FAV 8 eine 4-tägige Bebrütungszeit der infizierten Kükennierenzellkulturen genügte, um eine deutliche Plaquebildung zu erzielen, während der etwas langsamer wachsende und auch geringer zytopathisch wirkende Stamm FAV 5 erst nach 5 Tagen gut sichtbare Plaques erzeugte.

Die Vermehrungsstudien über das AAAV und die Helferviren zeigen, daß in den vorliegenden Versuchen für beide Virusarten immer eine Ein-Schritt-Vermehrung erreicht werden konnte. Dies gilt auch bei der niedrigen Multiplizität von 1. Es wurden sowohl mit dem leichten als auch mit dem schweren AAAV Versuche durchgeführt. Zur Vermehrung des AAAV wurde das jeweilige Helfervirus gleichzeitig mit auf die Zellkulturen verimpft, sodaß für beide Virusarten stets ein gemeinsamer Bebrütungsbeginn der infizierten Zellen vorlag.

In den ersten Vermehrungsversuchen (Abb. 3 - 5) wurden das AAAV und die Adenoviren mit einer gleichen Infektionsdosis ($\text{MOI} = 10$) auf die Zellkulturen verimpft. Die Vermehrung des AAAV wies dabei eine Latenzzeit von 8 Stunden auf, der eine exponentielle Vermehrungsphase folgte, die nach etwa 24 Stunden abgeschlossen war. Demgegenüber verlief die Vermehrung der aviären Adenoviren mit einer etwas längeren Latenzzeit von 12 Stunden, gefolgt von einem zuerst langsamen Titeranstieg und einer exponentiellen Vermehrungsphase. Nach etwa 24 Stunden erreichte die Adenovirusvermehrung bei den Stämmen FAV 1 und FAV 8 in der Regel ihren Abschluß. Dies stimmte überein mit den Angaben von MONREAL (63) für das CELO-Virus (FAV 1). Eine Ausnahme bildete hierbei der Stamm FAV 5, dessen Vermehrung zumeist etwas langsamer und über einen längeren Zeitraum ablief. Aufgrund des geringeren zytopathischen Effekts, den dieser Stamm verursacht, sind die Wirtszellen länger in der Lage, die Viren zu vermehren. Dies wirkte sich ebenso auf den Vermehrungsablauf des AAAV aus, der dann auch über einen längeren Zeitraum andauerte. Während jedoch Untersuchungen von SMITH et al. (78) und SMITH und THIEL (79) ergeben hatten, daß die sich langsam vermehrenden und nur gering zytopathisch wirkenden humanen Adenovirusstämme die Vermehrung des humanen AAV wesentlich besser fördern als schneller wachsende Adenoviren, trifft dies für das aviäre System nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zu. Der aviäre Adenovirusstamm FAV 5 erwies sich in keinem der durchgeführten Versuche als ein besserer Helfer als die Stämme FAV 1 und FAV 8. Alle drei eingesetzten Adenovirusstämme zeigten keine deutlichen Unterschiede in ihrer Helferfunktion.

Als ein einflußreicher Faktor für den Beginn der AAAV-Vermehrung erwies sich die Multiplizität der eingesetzten Helferviren. Wurden die Adenoviren nur mit einer geringen Multiplizität ($\text{MOI} = 1$) verimpft, so führte dies zu einer Ver-

längerung der Latenzzeit des AAV von 8 Stunden auf 12 bis 16 Stunden. Eine Verkürzung der Latenzzeit auf unter 8 Stunden konnte jedoch durch eine Erhöhung der Adenovirusmenge bei gleichzeitiger Beimpfung nicht erreicht werden. PARKS et al. (67) haben die Vermehrung des humanen Adeno-assoziierten Virus Typ 4 und des Adenovirus SV 15 als Helfervirus untersucht und geben für das AAV und das Adenovirus eine Latenzzeit von 12 - 16 Stunden an. Untersuchungen von BLACKLOW et al. (11) und ITO et al. (41) erbrachten ähnliche Ergebnisse. Es scheint somit, daß sich die Latenzzeit der humanen Adeno-assoziierten Viren zwischen 10 und 15 Stunden bewegt. PARKS et al. (67), BLACKLOW et al. (11) und ITO et al. (41) konnten in ihren Untersuchungen jedoch feststellen, daß sich die Latenzzeit des humanen AAV auf 4 bis 6 Stunden verkürzen läßt, wenn die als Helfer eingesetzten Adenoviren etwa 10 bis 15 Stunden vor den Adeno-assoziierten Viren auf die Wirtszellen verimpft werden. Wie entsprechende Untersuchungen von LOGEMANN (Dissertation in Vorbereitung) in unserem Laboratorium zeigen, läßt sich die Latenzzeit des aviären Adeno-assoziierten Virus unter diesen Umständen ebenfalls verkürzen.

Bei den vorliegenden Vermehrungsstudien konnte gezeigt werden, daß das AAV unter bestimmten Bedingungen die Vermehrung der Adenoviren hemmt, wie dies auch schon von PRONOVOST et al. (69) beschrieben wurde. Das Ausmaß dieser Hemmung ist dabei direkt abhängig von der Menge des eingesetzten AAV. Während die Adenovirusstämme FAV 1 und FAV 8 in ihrer Vermehrung durch das mit einer Multiplizität von 10 eingesetzte AAV (Abb. 3 und 5) noch nicht beeinträchtigt wurden, zeigte sich bei FAV 5 schon eine leichte Hemmung (Abb. 4). Wurde die Multiplizität des AAV weiter erhöht (Abb. 9 und 11), so wiesen auch die Stämme FAV 1 und FAV 8 eine Verzögerung in ihrer Vermehrung auf. Um diesen hemmenden Einfluß des AAV auf die Vermehrung der Adenoviren genauer studieren zu können, führten wir zunächst mit dem Adenovirusstamm FAV 1

entsprechende Versuche durch (Abb. 12, 13 und 14). Dabei wurde ersichtlich, daß das FAV 1 durch das AAAV mit einer Multiplizität von 25 nur sehr gering in seiner Vermehrung gehemmt wurde, während bei einer AAAV-Multiplizität von 50 bereits eine eindeutige Hemmung der FAV 1-Vermehrung erreicht wurde. Dabei verlängerte sich die Latenzzeit des Adenovirus, die exponentielle Vermehrungsphase verlief weniger steil und das Plateau des Vermehrungszyklus lag um etwa 1,5 log-Stufen unter dem bei der FAV 1-Vermehrung in Abwesenheit des AAAV. In einem weiteren Versuch mit einer AAAV-Multiplizität von 100 konnte gezeigt werden, daß das FAV 1 dadurch noch stärker in seiner Vermehrung gehemmt wurde (Abb. 14).

Da vorhergegangene Vermehrungsstudien vermuten ließen, daß der Adenovirusstamm FAV 5 schon durch geringere AAAV-Mengen in seiner Vermehrung gehemmt wird, wurde dies in einem gekürzten Versuch (Abb. 15) überprüft. Dabei zeigte sich deutlich, daß das FAV 5 bereits durch eine AAAV-Multiplizität von 1 eine leichte Hemmung erfährt und daß diese mit ansteigender AAAV-Multiplizität weiter verstärkt wird.

Untersuchungen von ATCHISON et al. (4), HOGGAN et al. (39), SMITH und THIEL (79) und PARKS et al. (67) hatten schon früher gezeigt, daß das humane Adeno-assoziierte Virus die Vermehrung der humanen Adenoviren hemmen kann. CASTO et al. (19) konnten ebenfalls feststellen, daß sich diese Wirkung mit ansteigender Multiplizität der Adeno-assoziierten Viren verstärkt. Sie berichteten jedoch auch darüber, daß die Adenoviren diesen hemmenden Einfluß des AAV überwinden können, wenn sie selbst mit einer hohen Multiplizität verimpft werden. Ob dies für das aviäre System ebenfalls zutrifft, wurde im Rahmen der vorliegenden Studien nicht überprüft.

PRONOVOST et al. (69) konnten eine unterschiedliche Wirkung von leichtem und schwerem aviärem Adeno-assoziiertem Virus auf die aviären Adenoviren nachweisen. Sie untersuchten,

welchen Einfluß das AAAV auf die Plaquebildung der Adenoviren zeigt und stellten fest, daß das leichte AAAV mit ansteigender Multiplizität die Plaquebildung der Adenoviren immer stärker hemmt. Das schwere AAAV hingegen ist nach diesen Untersuchungen in der Lage, im Bereich einer Multiplizität von 0,1 bis 1 die Plaquebildung der Adenoviren sogar zu fördern. Erst ab einer Multiplizität von 40 zeigt sich dann bei ihren Untersuchungen eine hemmende Wirkung. Durch die in der vorliegenden Arbeit mit dem schweren AAAV durchgeführten Vermehrungsstudien ließ sich eine Steigerung der Adenovirusvermehrung nicht erreichen. Das schwere AAAV, mit einer Multiplizität von 1 auf die Zellkulturen verimpft, beeinflusste den Vermehrungsablauf der Adenoviren weder fördernd noch hemmend, wobei nicht auszuschließen ist, daß auch das schwere AAAV bei hoher Multiplizität eine hemmende Wirkung auf die Adenovirusvermehrung ausübt. Dies konnte jedoch in den vorliegenden Versuchen nicht überprüft werden, da das schwere AAAV-Material nur in sehr geringer Menge zur Verfügung stand.

Offensichtlich ist die Beeinflussung der Adenoviren durch die Adeno-assoziierten Viren ein quantitatives Problem, das bereits zum Zeitpunkt der Infektion einer Zelle mit den beiden Virusarten bestimmt wird. Wenn man überlegt, daß die aviären Adeno-assoziierten Viren weit verbreitet sind (24) und auch bei einem großen Teil von Adenovirus-Isolaten aviäre Adeno-assoziierte Viren nachgewiesen wurden (62), so ist nicht auszuschließen, daß auch im Organismus die doppelte Infektion einen Einfluß auf die Adenovirusvermehrung ausüben kann. Dies würde im besonderen bei einer hohen Dosis von AAAV und einer geringen Menge von Adenoviren der Fall sein (vgl. hierzu Abb. 14), wobei hier auch die weitere Vermehrung des AAAV nur eine geringe Tendenz zeigt. Ein schädigender Einfluß dieser beiden Virusarten auf den Organismus könnte dadurch unterdrückt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vermehrung des Helfervirus-abhängigen aviären Adeno-assoziierten Virus (AAAV) und sein Einfluß auf die als Helferviren eingesetzten aviären Adenoviren wurden untersucht. Für die Vermehrungsuntersuchungen von aviären Adeno-assoziierten Virus wurde der Stamm ATCC VR-865 verwandt, als Helferviren wurden die aviären Adenovirusstämme FAV 1, FAV 5 und FAV 8 eingesetzt. Die Vermehrungsstudien wurden sowohl mit einer leichten Fraktion als auch mit einer schweren Fraktion des AAAV durchgeführt.

Die Reindarstellung des aviären Adeno-assoziierten Virus erfolgte über CsCl-Gleichgewichts-Dichtegradienten und eine Immunopräzipitation. Zur Titerbestimmung des AAAV wurde ein indirekter Immunofluoreszenztest angewandt, die Titer der aviären Adenoviren wurden im Plaquetest bestimmt. Das AAAV und die Helferviren wurden mit unterschiedlichen Multiplizitäten zum gleichen Zeitpunkt auf Kükennierenzellkulturen verimpft.

In allen Versuchen erfolgte eine Ein-Schritt-Vermehrung. Der Vermehrungszyklus des aviären Adeno-assoziierten Virus verlief über 24 Stunden. Die Latenzzeit betrug dabei mindestens 8 Stunden und verlängerte sich, wenn das Helfervirus nur in sehr geringen Mengen eingesetzt wurde. In ihrem Verhalten zeigten die leichte und die schwere Fraktion des aviären Adeno-assoziierten Virus keine Unterschiede.

Die aviären Adenoviren benötigten für den Ablauf eines Vermehrungszyklus ebenfalls etwa 24 Stunden. Ihre Latenzzeit lag bei 12 bis 16 Stunden. In ihrem Vermehrungsverhalten und in ihrer Helfertätigkeit unterschieden sich die eingesetzten aviären Adenovirusstämme nicht, jedoch verlief die Vermehrung

des geringer zytopathisch wirkenden Adenovirusstammes FAV 5 etwas langsamer als bei den Stämmen FAV 1 und FAV 8.

Die durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, daß das aviäre Adeno-assoziierte Virus unter bestimmten Bedingungen die Vermehrung der aviären Adenoviren hemmt. Diese Wirkung zeigte eine Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten aviären Adenoviren. Mit ansteigender Multiplizität der aviären Adeno-assoziierten Viren wurden die aviären Adenoviren stärker in ihrer Vermehrung gehemmt.

SUMMARY

The multiplication of the helpervirus-dependent avian adeno-associated virus (AAAV) of ATCC-865 strain and its effect on the multiplication of several avian adenovirus serotypes were studied. The avian adenovirus serotypes FAV 1, FAV 5 and FAV 8 were used as helperviruses. The growth cycle studies were performed with a light as well as with a heavy fraction of AAAV.

AAAV was purified by several cycles of isopycnic centrifugation in CsCl gradients and by immunoprecipitation. Titration of AAAV infectivity was done by indirect immunofluorescence technique. Adenovirus infectivity was assayed by plaque tests. Chicken kidney cell cultures were simultaneously infected with various multiplicities of AAAV and avian adenoviruses.

In all experiments the viruses showed an one-step-replication. A single cycle of growth for AAAV was completed after about 24 hours. AAAV antigen was first detected by immunofluorescence of at least 8 hours after inoculation, but the latent period extended when only small quantities of helper-viruses were used. The growth cycles of light and heavy particles of AAAV showed no differences.

A single growth cycle of adenovirus was also completed after about 24 hours and the latent period was 12 to 16 hours. The examined adenoviruses did not differ in their helper function.

Experimental results revealed that AAAV can inhibit the multiplication of avian adenoviruses. The degree of inhibition depended on the input multiplicity of AAAV. A higher degree of AAAV multiplicity increasingly depressed the adenovirus multiplication.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARCHETTI, I., E. BERECKZY and D. S. BOCCIARELLI, 1966:
A small virus associated with simian adenovirus
SV 11.
Virology, 29, 671 - 673
2. ATCHISON, R. W., 1970: The role of herpesviruses in
adenovirus-associated replication in vitro.
Virology, 42, 155 - 162
3. ATCHISON, R. W., B. C. CASTO and W. McD. HAMMON, 1965:
Adenovirus-associated defective virus particles.
Science, 149, 754 - 756
4. ATCHISON, R. W., B. C. CASTO and W. McD. HAMMON, 1966:
Electron microscopy of adenovirus-associated virus
(AAV) in cell cultures.
Virology, 29, 353 - 357
5. BACHMANN, P. A., M.D. HOGGAN, J. L. MELNICK, H. G. PEREIRA
and C. VAGO, 1975: Parvoviridae.
Intervirology, 5, 83 - 92
6. BACHMANN, P. A., M. D. HOGGAN, E. KURSTAK, J. L. MELNICK,
H. G. PEREIRA, P. TATTERSALL and C. VAGO, 1979:
Parvoviridae: Second report.
Intervirology, 11, 248 - 254
7. BAUER, H.-J., und G. MONREAL, 1984: The immunoprecipitation
of the helper avian adenovirus as purification
methode for the adeno-associated virus (AAAV).
(In Vorbereitung)

8. BERNIS, K. I., and J. A. ROSE, 1970: Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: Isolation and separation of complementary single strands.
J. Virol., 5, 693 - 699
9. BERNIS, K. I., and S. ADLER, 1972: Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains.
J. Virol., 9, 394 - 396
10. BERNIS, K. I., T. C. PINKERTON, G. F. THOMAS and M. D. HOGGAN, 1975: Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells.
Virology, 68, 556 - 560
11. BLACKLOW, N. R., M. D. HOGGAN and W. P. ROWE, 1967: Immunofluorescent studies of the potentiation of an adenovirus-associated virus by adenovirus 7.
J. Exp. Med., 125, 755 - 765
12. BLACKLOW, N. R., R. DOLIN and M. D. HOGGAN, 1971: Studies of enhancement of an adenovirus-associated virus by herpes simplex virus.
J. Gen. Virol., 10, 29 - 36
13. BLACKLOW, N. R., G. CUKOR, S. KIBRICK and G. QUINNAN, 1978: Interactions of adeno-associated viruses with cells transformed by herpes simplex virus. In: Replication of mammalian parvoviruses. Ed. by D. C. Ward and P. Tattersall.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
S. 87 - 98

14. BOUCHER, D. W., J. L. MELNICK and H. D. MAYOR, 1971:
Nonencapsidated infectious DNA of adeno-satellite
virus in cells coinfecting with herpesvirus.
Science, 173, 1243 - 1245
15. BULLER, R. M. L., J. E. JANIK, E. B. SEBRING and J. A.
ROSE, 1981: Herpes simplex virus types 1 and 2
completely help adenovirus-associated virus
replication.
J. Virol., 40, 241 - 247
16. CARTER, B. J., G. KHOURY and J. A. ROSE, 1972:
Adenovirus-associated virus multiplication.
J. Virol., 10, 1118 - 1125
17. CARTER, B. J., K. H. FIFE, L. M. DE LA MAZA and
K. I. BERNIS, 1976: Genome localization of adeno-
associated virus RNA.
J. Virol., 19, 1044 - 1053
18. CARTER, B. J., C. A. LAUGHLIN, L. M. DE LA MAZA and
M. MYERS, 1979: Adeno-associated virus
autointerference.
Virology, 92, 449 - 462
19. CASTO, B. C., R. W. ATCHISON and W. McD. HAMMON, 1967:
Studies on the relationship between adeno-
associated virus type 1 (AAV-1) and adenoviruses.
I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures
and its effects on helper adenovirus.
Virology, 32, 52 - 59
20. CASTO, B. C., and C. R. GOODHEART, 1972: Inhibition of
adenoviruses transformations in vitro by AAV-1.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 140, 72 - 78

21. CHEUNG, A. K. M., M. D. HOGGAN, W. W. HAUSWIRTH and K. I. BERNS, 1980: Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells.
J. Virol., 33, 379 - 748
22. CLINTON, G. M., and M. HAYASHI, 1976: The parvovirus MVM: A comparison of heavy and light particle infectivity and their density conversion in vitro.
Virology, 74, 56 - 63
23. CRAWFORD, L. V., 1966: A minute virus of mice.
Virology, 29, 605 - 612
24. DAWSON, G. J., L. N. ORSI, V. J. YATES, P. W. CHANG and A. D. PRONOVOST, 1979: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adenovirus and avian adenovirus-associated virus in chickens.
Avian Dis., 24, 393 - 401
25. DAWSON, G. J., V. J. YATES, P. W. CHANG, L. N. ORSI and A. D. PRONOVOST, 1979: Egg transmission of avian adenovirus-associated virus and CELO virus during a naturally occurring infection.
Am. J. Vet. Res., 40, 1624 - 1627
26. DAWSON, G. J., P. W. CHANG, V. J. YATES and D. E. FRY, 1980: Neutralizing antibodies to CELO and avian adenovirus-associated virus in the albumen of chicken eggs.
Avian Dis., 24, 890 - 895

27. DAWSON, G. J., V. J. YATES, P. W. CHANG and W. WATTANAVIJARIN, 1981: Egg transmission of avian adenovirus-associated virus and CELO virus during experimental infections.
Am. J. Vet. Res., 42, 1833 - 1837
28. DAWSON, G. J., V. J. YATES, P. W. CHANG and J. J. OPRANDY, 1982: Is avian adeno-associated virus an endogenous virus of chicken cells?
Nature, 298, 580 - 582
29. DUTTA, S. K., and B. S. POMERY, 1967: Electron microscopic studies of quail bronchitis virus.
Am. J. Vet. Res., 28, 296 - 299
30. FADLEY, A. M., and R. W. WINTERFIELD, 1973: Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis hemorrhages and aplastic anemia in chickens.
Avian Dis., 17, 182 - 193
31. FADLEY, A. M., and K. NAZERIAN, 1984: Efficacy and safety of a cell-culture live virus vaccine for hemorrhagic enteritis of turkeys: Laboratory studies.
Avian Dis., 28, 183 - 196
32. GELDERBLOM, H., and I. MAICHLE-LAUPPE, 1982: The fibers of fowl adenoviruses.
Arch. Virology, 72, 289 - 298
33. GREEN, M., and G. E. DAESCH, 1961: Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures.
Virology, 13, 169 - 176

34. HANDA, H., K. SHIROKI and H. SHIMOJO, 1977: Establishment and characterization of KB cell lines latently infected with adeno-associated virus type 1. Virology, 82, 84 - 92
35. HARTLEY, J. W., and W. P. ROWE, 1960: A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. Virology, 11, 645 - 647
36. HASELKORN, R., 1965: Adenovirus "helpers". Science, 150, 921
37. HOFFMANN, R., E. WESSLING, P. DORN and H. DANGSCHAT, 1975: Lesions in chickens with spontaneous or experimental infectious hepatomyelopoietic disease (inclusion body hepatitis) in Germany. Avian Dis., 19, 224 - 236
38. HOGGAN, M. D., 1971: Small DNA viruses. In: Comparative virology. Ed. by K. Maramorosch and E. Kurstak. Academic Press Inc., New York
S. 43 - 79
39. HOGGAN, M. D., N. R. BLACKLOW and W. P. ROWE, 1966: Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: Physical, biological and immunological characteristics. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1467 - 1474
40. HOGGAN, M. D., G. F. THOMAS, F. B. THOMAS and F. B. JOHNSON, 1972: Continuous "carriage" of adenovirus associated virus genome in cell cultures in the absence of helper adenovirus. In: Proceedings of the Fourth Lepetit Colloquium, Cocoyac, Mexico, 1972. North Holland Publishing Co., Amsterdam

41. ITO, M., J. L. MEINICK and H. D. MAYOR, 1967: An immunofluorescence assay for studying replication of adeno-satellite virus.
J. Gen. Virol., 1, 199 - 209
42. JOHNSON, F. B., H. L. OZER and M. D. HOGGAN, 1971: Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3.
J. Virol., 8, 860 - 863
43. KASSANIS, B., 1962: Properties and behavior of a virus depending for its multiplication on another.
J. Gen. Microbiol., 27, 447 - 488
44. KIRCHSTEIN, R. L., K. O. SMITH and E. A. PETERS, 1968: Inhibition of adenovirus type 12 oncogenicity by adeno-associated virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123, 670 - 673
45. KRAFT, V., S. GRUND and G. MONREAL, 1979: Ultrastructural characterization of isolate 127 of egg drop syndrome 1976 virus as an adenovirus.
Avian Pathol., 8, 353 - 361
46. LAUGHLIN, C. A., M. W. MYERS, D. L. RISIN and B. J. CARTER, 1979: Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus.
Virology, 94, 162 - 174
47. LAUGHLIN, C. A., N. JONES and B. J. CARTER, 1982: Effect of deletions in adenovirus early region 1 genes upon replication of adeno-associated virus.
J. Virol., 41, 868 - 876

48. LAVER, W. G., H. B. YOUNGHUSBAND and N. G. WRIGLEY, 1971:
Purification and properties of chick embryo lethal
orphan virus (an avian adenovirus).
Virology, 45, 598 - 614
49. LIPPS, v., B., and H. D. MAYOR, 1981: Characterization
of heavy particles of adeno-associated virus type 1.
J. Gen. Virol., 58, 63 - 72
50. McFERRAN, J. B., 1981: Immunity to adenoviruses. In:
Avian immunology. Ed. by M. E. Rose, L. N. Payne
and B. M. Freeman.
British Poultry Science Ltd., Edinburgh
S. 187 - 203
51. McFERRAN, J. B. and B. McC. ADAIR, 1977: Avian adeno-
viruses - a review.
Avian Pathol., 6, 189 - 217
52. McFERRAN, J. B., and T. J. CONNOR, 1977: Further studies
on the classification of fowl adenoviruses.
Avian Dis., 21, 585 - 595
53. MATTHEWS, R. E. F., 1982: Classification and nomenclature
of viruses.
Intervirology, 17, 1 - 199
54. MAYOR, H. D., R. M. JAMISON, L. E. JORDAN and J. L.
MELNICK, 1965: Structure and composition of a
small particle prepared from a simian adenovirus.
J. Bacteriol., 90, 235 - 242
55. MAYOR, H. D., and J. L. MELNICK, 1966: Small deoxyribo-
nucleic acid-containing viruses (picornavirus group).
Nature, 210, 331 - 332

56. MAYOR, H. D., M. ITO, L. E. JORDAN and J. L. MELNIK,
1967: Morphological studies on the replication
of a defective satellite virus and its helper
adenovirus.
J. Nat. Cancer Inst., 38, 805 - 811
57. MAYOR, H. D., K. TORIKAI and J. L. MELNICK, 1969:
Plus and minus single-stranded DNA separately
encapsidated in adeno-associated satellite virions.
Science, 166, 1280 - 1282
58. MAYOR, H. D., G. S. HOULDITCH and D. M. MUMFORD, 1973:
Influence of adeno-associated satellite on
adenovirus-induced tumors in hamsters.
Nature, New Biol., 241, 44 - 46
59. MAZA, DE LA, L. M., and B. J. CARTER, 1978: DNA structure
of incomplete adeno-associated virus particles.
In: Replication of mammalian parvoviruses.
Ed. by D. C. Ward and P. Tattersall.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
New York
S. 193 - 204
60. MAZA, DE LA, L. M., and B. J. CARTER, 1980: Heavy and
light particles of adeno-associated virus.
J. Virol., 3, 1129 - 1137
61. MELNICK, J. L., H. D. MAYOR, K. O. SMITH and F. RAPP,
1965: Association of 20-millimicron particles
with adenoviruses.
J. Bacteriol., 90, 271 - 274

62. MISHAD, EL, A. M., K. J. McCORMICK, V. J. YATES and J. J. TRENTIN, 1975: Detection and serological identification of adeno-associated virus in avian adenovirus stocks.
Infect. Immun., 11, 287 - 289
63. MONREAL, G., 1967: Untersuchungen über die Vermehrung eines adeno-ähnlichen Hühnervirus (CELO).
Arch. gesamte Virusforsch., 20, 143 - 163
64. MONREAL, G., 1984: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen 11 Serotypen der aviären Adenoviren.
Arch. Geflügelkunde (Im Druck)
65. MONREAL, G., und R. DORN, 1981: Vergleichende Untersuchungen zum Antikörpernachweis bei Hühneradeno- und Egg-drop-syndrom 76 Virus-Infektionen.
Dtsch. tierärztl. Wschr., 88, 508 - 511
66. NORRBY, E., A. BARTHA, P. Boulanger, R. S. DREIZIN, H. S. GINSBERG, S. S. KALTER, H. KAWAMARA, W. P. ROWE, W. C. RUSSEL, R. W. SCHLESINGER and R. WIGAND, 1976: Adenoviridae.
Intervirology, 7, 117 - 125
67. PARKS, W. P., J. L. MELNICK, R. RONGEY and H. D. MAYOR, 1966: Physical assay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus.
J. Virol., 1, 171 - 180
68. PRONOVOST, A. D., V. J. YATES and D. E. FRY, 1977: Effect of avian adeno-associated virus on pathogenicity of tipton virus in chicks.
Avian Dis., 22, 354 - 357

69. PRONOVOST, A. D., V. J. YATES and D. E. FRY, 1979:
Inhibition and enhancement of avian adenovirus
plaque production by heavy and light avian
adenovirus-associated viral particles.
Am. J. Vet. Res., 40, 549 - 551
70. PRONOVOST, A. D., V. J. YATES and D. E. FRY, 1980:
Populations of infectious virus produced during
avian adenovirus-associated virus infection.
Intervirology, 13, 289 - 298
71. ROSE, J. A., 1974: Parvovirus reproduction. In:
Comprehensive Virology. Ed. by H. Frankel-Conrat
and R. R. Wagner.
Plenum Press, New York, 3, 1 - 61
72. ROSE, J. A., M. D. HOGGAN, F. KOCZOT and A. J. SHATKIN,
1968: Genetic relatedness studies with adenovirus-
associated viruses.
J. Virology, 2, 999 - 1005
73. ROSE, J. A., and F. KOCZOT, 1971: Adenovirus-associated
virus multiplication.
J. Virology, 8, 771 - 777
74. ROSE, J. A., and F. KOCZOT, 1972: Adenovirus-associated
virus multiplication. VII. Helper requirement for
viral deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid
synthesis.
J. Virology, 10, 1 - 8
75. SALO, R. J., and H. D. MAYOR, 1977: Structural
polypeptides of parvoviruses.
Virology, 78, 340 - 345

76. SALO, R. J., and H. D. MAYOR, 1979: Adenovirus-associated virus polypeptides synthesized in cells coinfecting with either adenovirus or herpesvirus.
Virology, 93, 237 - 243
77. SIEGL, G., 1976: The parvoviruses.
Springer-Verlag, Wien New York
78. SMITH, K. O., W. D. GEHLE and J. F. THIEL, 1966:
Properties of small virus associated with
adenovirus type 4.
J. Immunol., 97, 754 - 766
79. SMITH, K. O., and J. F. THIEL, 1967: Adeno-associated virus studies employing a fluorescent focus assay technique.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 887 - 892
80. WIGAND, R., A. BARTHA, R. S. DREIZIN, H. ESCHE, H. S. GINSBERG, M. GREEN, J. C. HIERHOLZER, S. S. KALTER, J. B. McFERRAN, U. PETTERSSON, W. C. RUSSEL and G. WADELL, 1982: Adenoviridae: Second report.
Intervirology, 18, 169 - 176
81. YATES, V. J., A. M. EL MISHAD, K. J. McCORMICK and J. J. TRENTIN, 1973: Isolation and characterisation of an avian adenovirus-associated virus.
Infect. Immun., 7, 973 - 980
82. YATES, V. J., A. D. PRONOVOST, Y. O. RHEE and D. E. FRY, 1979: Adenovirus-associated virus-precipitating antibody as an early indicator of an adenovirus infection.
Am. J. Vet. Res., 40, 277 - 279

83. YATES, V. J., Y. O. RHEE, D. E. FRY, A. M. EL MISHAD
and K. J. McCORMICK, 1975: The presence of avian
adenovirus and adeno-associated virus in healthy
chickens.
Avian Dis., 20, 146 - 152
84. YATES, V. J., and Y. O. RHEE, 1976: Procedure of the
isolation of avian adeno and avian adeno-
associated viruses.
Avian Dis., 21, 315 - 318
85. YATES, V. J., Y. O. RHEE and D. E. FRY, 1977:
Serological response of chickens exposed to a
type 1 avian adenovirus alone or in combination
with the adeno-associated virus.
Avian Dis., 21, 408 - 414
86. YOUNG, J. F., and H. D. MAYOR, 1979: Adeno-associated
virus - an extreme state of viral defectiveness.
Prog. Med. Virol., 25, 113 - 132

Herrn Prof. G. Monreal danke ich für die Überlassung des
Themas und die freundliche Aufnahme im Institut sowie für
seine mir stets gewährte wissenschaftliche und auch
persönliche Unterstützung und Beratung.

Herrn Dr. H.-J. Bauer danke ich für seine umfangreiche
Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau G. Beyer und
Frau M. Hoppe für ihre Mitarbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Angehörigen des Instituts
für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Susann Hauschild

29. 12. 1955 geboren in Berlin
- 1962 - 1966 Grundschulbesuch an verschiedenen Schulen
in Preetz, Wasbek und Neumünster
- 1966 - 1973 Oberschulausbildung an der
Klaus-Groth-Schule, Neumünster und der
Schadow-Oberschule, Berlin-Zehlendorf
7. 12. 1973 Reifeprüfung an der Schadow-Oberschule,
Berlin-Zehlendorf
- 1974 - 1976 Ausbildung zur medizinisch-technischen
Assistentin an der Lehranstalt für
medizinisch-technische Assistentinnen,
Allgemeines Krankenhaus St. Georg in Hamburg
- 1976 - 1977 Medizinisch-technische Assistentin im
Zentrallabor des Allgemeinen Krankenhauses
Eilbek in Hamburg
- 1977 - 1982 Studium der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin
22. 12. 1982 Approbation als Tierärztin
- ab März 1983 Arbeit an der Dissertation im Institut für
Geflügelkrankheiten des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
bei Herrn Prof. Dr. G. Monreal

